

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

PAULA MIWA RABELO HIGASI

**MONO-OXIGENASE LÍTICA DE POLISSACARÍDEOS TtLPMO9H:  
CARACTERIZAÇÃO E MECANISMOS MOLECULARES DE  
ATIVAÇÃO CATALÍTICA**

São Carlos  
2022



PAULA MIWA RABELO HIGASI

**MONO-OXIGENASE LÍTICA DE POLISSACARÍDEOS TtLPMO9H:  
CARACTERIZAÇÃO E MECANISMOS MOLECULARES DE  
ATIVÇÃO CATALÍTICA**

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

Área de concentração: Física Aplicada  
Opção: Física Biomolecular  
Orientadora Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão original

São Carlos  
2022

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

Higasi, Paula Miwa Rabelo

Mono-oxigenase litica de polissacarideos TtLPMO9H: caracterização e mecanismos moleculares de ativação catalítica. / Paula Miwa Rabelo Higasi; orientador Igor Polikarpov -- São Carlos, 2022.

123 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Mono-oxigenase litica de polissacarideos. 2. LPMO.  
3. AA9. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Miwa Rabelo Higasi

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

Aprovado (a) em: 04/08/2022

Comissão Julgadora

Dr(a). Igor Polikarpov

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Fernando Segato

Instituição: (EEL/USP)

Dr(a). Mário Tyago Murakami

Instituição: (CNPEM/Campinas)

Dr(a). Marcos Silveira Buckeridge

Instituição: (IB/USP)

Dr(a). Ronaldo Alves Pinto Nagem

(UFMG/Belo Horizonte)



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, sem o apoio dos quais ele não seria possível.





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais e toda a minha família por me apoiarem e estarem ao meu lado ao longo de toda a trajetória.

Agradeço ao Professor Igor pela orientação e pelas oportunidades que tive de pesquisar e me desenvolver.

Agradeço aos amigos e colegas de Grupo que estiveram presentes ao longo dos anos de doutorado. À Vanessa, que me acompanhou desde o início do doutorado, agradeço pelos conselhos científicos e por ajudar a resolver todo tipo de dificuldades ao longo do caminho.

Agradeço a Ana Elisa, Aline, Lorenzo, Melissa, Milena, Ane, Caio, Lorgio, Aissata, Raíssa, Lívia e Angélica pela companhia, conversas e cafês.

Agradeço aos técnicos do laboratório, Maria, Josimar e Possatto, pela paciência e por resolverem todos os problemas que levei até eles.

Agradeço ao IFSC e as agências CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada

.



## RESUMO

HIGASI, P. M. R. **Mono-oxigenase lítica de polissacarídeos TtLPMO9H**: caracterização e mecanismos moleculares de ativação catalítica. 2022. 123 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

A degradação da biomassa lignocelulósica é essencial para o aproveitamento dessa matéria-prima para a produção de biocombustíveis e compostos químicos. Apesar de aplicada há anos, a degradação enzimática dessa biomassa ainda envolve novidades, incluindo um tipo completamente distinto de enzimas, as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), cuja ação potencializa a atividade das hidrolases de glicosídeos que já são utilizadas. Descoberta há pouco mais de uma década, muitos aspectos básicos das LPMOs ainda são desconhecidos. No trabalho desenvolvido, uma LPMO recombinante do ascomiceto *Thermothelomyces thermophilus*, TtLPMO9H, foi estudada quanto a sua especificidade de substrato, região-seletividade, estabilidade térmica e ativação. TtLPMO9H, pertencente à família AA9, teve atividade em celulose e hemicelulose, com ação nos carbonos C1 e C4 da cadeia polissacarídica e gerou celo-oligossacarídeos oxidados e não oxidados. Apresentou estabilidade térmica, e esta propriedade foi usada para sua purificação. A enzima teve atividade em ampla extensão de pHs, e a variação deste influenciou o perfil de produtos liberados por TtLPMO9H. Esta LPMO foi ainda ativada por diferentes sistemas, incluindo pequenas moléculas com e sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, clorofilina e luz, múltiplas oxidoredutases, incluindo duas oxidases que nunca foram reportadas para a ativação de LPMO, e por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Palavras-chave: Mono-oxigenase lítica de polissacarídeos. LPMO. AA9.



## ABSTRACT

HIGASI, P. M. R. **Lytic polysaccharide monooxygenase TtLPMO9H: features and molecular mechanisms of catalytic activation.** 2022. 123 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The degradation of lignocellulosic biomass is essential for the use of this raw material to produce biofuels and biochemical compounds. Although it has been applied for years, the enzymatic degradation of this biomass still offers novelties, including a completely different type of enzyme, the lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs), whose action potentiates the activity of the glycoside hydrolases that are already used. Discovered just over a decade ago, many basic aspects of LPMOs are still unknown. In the work developed, a recombinant LPMO of the ascomycete *Thermothelomyces thermophilus*, TtLPMO9H, was studied for its substrate specificity, regioselectivity, thermal stability and activation. TtLPMO9H, which belongs to the AA9 family, had activity on cellulose and hemicellulose, acted on the C1 and C4 carbons of the polysaccharide chain and generated oxidized and non-oxidized cello-oligosaccharides. It showed thermal stability, and this property was used for its purification. The enzyme had activity over a wide range of pHs, and its variation influenced the profile of products released by TtLPMO9H. This LPMO was further activated by different systems, including small molecules with and without addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, chlorophyllin and light, multiple oxidoreductases, including two oxidases that have never been reported to activate LPMO, as well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Keywords: Lytic polysaccharide monooxygenase. LPMO. AA9.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de como as enzimas atuam sobre a celulose .....	24
Figura 2 - Estrutura representativas de AA9s de acordo com régio-seletividade .....	31
Figura 3 - Produtos de oxidação por LPMO .....	33
Figura 4 - Agentes redutores de LPMO .....	36
Figura 5 - Sistemas conhecidos de redução de LPMOs. ....	42
Figura 6 - Curvas das cromatografias de purificação e gel de eletroforese SDS-PAGE de TtLPMO9H purificada .....	51
Figura 7 - Temperaturas de desenovelamento de TtLPMO9H .....	52
Figura 8 - Efeito de tratamento térmico na atividade de LPMO e de hidrolases .....	53
Figura 9 - Efeito de pH na atividade de TtLPMO9 .....	54
Figura 10 - Quantificação de produtos solúveis formados em reações em pH 5.0 ou pH 7.0, com ácido ascórbico ou gálico, em três tempos .....	55
Figura 11 - Ativação de TtLPMO9H com clorofilina e luz. ....	56
Figura 12 - Quantificação dos produtos liberados em reações com luz ou no escuro .....	57
Figura 13 - Atividade de TtLPMO9H em diferentes substratos .....	57
Figura 14 - Atividade de TtLPMO9H em xiloglucano .....	58
Figura 15 - Envelope ab initio de TtLPMO9H a partir de dados de SAXS .....	59
Figura 16 - Ativação de LPMOs com MtAAOx. ....	66
Figura 17 - Efeito da variação na concentração de MtAAOx. ....	67
Figura 18 - Efeito da variação de álcool veratrílico na atividade de TtLPMO9H .....	68
Figura 19 - Produtos da ativação por MtAAOx e ácido ascórbico ao longo do tempo .....	69
Figura 20 - Efeito da adição de catalase as reações de TtLPMO9H e MtAAOx. ....	70
Figura 21 - Efeito da desnaturação de MtAAOx .....	71
Figura 22 - Efeito da adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à reação de TtLPMO9H e álcool veratrílico. ....	72
Figura 23 - Re-oxidação de MtAAOx com TtLPMO9H. ....	73
Figura 24 - Redução de TtLPMO9H por substratos de MtAAOx .....	73
Figura 25 - Análise de produtos liberados em reações com LPMO e CDH. ....	75
Figura 26 - Cromatogramas de produtos liberados em reações com LPMO e GLOX. ....	77
Figura 27 - Esquema de sistema LPMO-AAO. ....	79
Figura 28 - Perfis de produtos de LPMO com celobiose e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	85
Figura 29 - Reações controle entre CuSO <sub>4</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	86
Figura 30 - Resposta de TtLPMO9H em PASC à variação da concentração de celobiose. ....	87

Figura 31 - Resposta de TtLPMO9H a três dissacarídeos adicionados às reações em substratos celulósicos em três pHs.....	87
Figura 32 - Comparação dos produtos formados com e sem adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	88
Figura 33 - Cromatogramas de produtos de LPMOs com três substratos e variação de pH....	89
Figura 34 - Áreas dos produtos de TtLPMO9H em xiloglucano.....	90
Figura 35 - Áreas de produtos liberados por TtLPMO9H em PASC.....	92
Figura 36 - Áreas de produtos liberados por MtLPMO9A em PASC.....	93
Figura 37 - Áreas de produtos liberados por TtLPMO9H em PASC.....	94
Figura 38 - Resposta de TtLPMO9H a variação da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> adicionado.....	95
Figura 39 - Estado redox de TtLPMO9H com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	96
Figura 40 - Quantificação de atividade de LPMO por Amplex Red.....	116
Figura 41 - Atividade de LPMO com 2,6-DMP.....	117
Figura 42 - Dendograma de TtLPMO9H e AA9s caracterizadas.....	119
Figura 43 - Espectro MALDI-ToF de produtos de tamanhos entre DP4 e DP9 liberados pela atividade de TtLPMO9H em PASC.....	120
Figura 44 - Detalhe dos produtos de DP8 detectados por MALDI-ToF.....	121
Figura 45 - Processamento e análise dos dados de SAXS.....	122
Figura 46 - Aminoácidos aromáticos próximos ao cobre catalítico.....	123



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade auxiliar
AAO	Aril-álcool oxidase
BG	$\beta$ -glicosidase
CAZy	Carbohydrate Active Enzymes Database
CBH	Celobiohidrolase
CBM	Módulo de ligação a carboidrato
CDH	Celobiose desidrogenase
CYT	Citocromo
DH	Desidrogenase
DP	Grau de polimerização
EG	Endoglucanase
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
GH	Hidrolase de glicosídeo
GMC	Superfamília glicose-metanol-colina oxidase
HPAEC-PAD	High performance anion exchange chromatography with Pulsed amperometric detection
HRP	Horseradish peroxidase
LPMO	Mono-oxigenase lítica de polissacarídeo
PASC	Phosphoric acid swollen cellulose



## SUMÁRIO

---

1	Introdução .....	23
1.1	Contextualização .....	23
1.2	Degradação da celulose .....	24
1.3	Motivação .....	25
2	Revisão bibliográfica .....	27
2.1	Histórico .....	27
2.2	Famílias de LPMOs .....	28
2.3	Estrutura geral .....	30
2.4	Substratos .....	31
2.5	Régio-especificidade .....	33
2.6	Oxigênio vs peróxido de hidrogênio .....	34
2.7	Redução de LPMO por pequenas moléculas .....	35
2.8	Relação entre LPMOs e outras enzimas auxiliares .....	37
2.9	Luz .....	40
2.10	Função biológica .....	42
2.11	Aplicações .....	43
3	Caracterização de TtLPMO9H e ativação por luz .....	45
3.1	Introdução .....	45
3.2	Materiais e metodologias .....	45
3.2.1	Produção e Purificação .....	45
3.2.2	Análise de sequência de aminoácidos .....	46
3.2.3	Thermofluor .....	47
3.2.4	Preparação de redutores .....	47
3.2.5	Atividade enzimática por produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	47
3.2.6	Análise de contaminantes celulolíticos .....	47

3.2.7	Purificação por aquecimento .....	48
3.2.8	Efeito do pH.....	48
3.2.9	Especificidade .....	49
3.2.10	Ativação por luz.....	49
3.2.11	HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection) .....	49
3.2.12	Análise de espalhamento de raios-X a baixo ângulo e modelo estrutural de baixa resolução.....	50
3.3	Resultados e Discussão .....	51
3.4	Discussão .....	59
4	LPMOs e oxidoredutases .....	63
4.1	Introdução .....	63
4.2	Materiais e Métodos .....	63
4.2.1	Produção das enzimas .....	63
4.2.2	Ativação por MtAAOx .....	64
4.2.3	Papel de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na ativação de TtLPMO9H .....	64
4.2.4	Atividade de oxidase de TtLPMO9H .....	65
4.2.5	Transferência direta de elétrons entre MtAAOx e TtLPMO9H .....	65
4.2.6	Ativação por MtGLOX e MtCDH.....	65
4.2.7	Deteção de celo-oligossacarídeos por HPAEC-PAD .....	65
4.3	Resultados .....	66
4.3.1	Ativação de LPMOs por <i>MtAAOx</i> e álcool veratrílico .....	66
4.3.2	Ativação de LPMOs por MtCDH e MtGLOX.....	74
4.4	Discussão .....	78
5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : redutor de LPMO? .....	83
5.1	Introdução .....	83
5.2	Materiais e Métodos .....	83
5.2.1	Enzimas e reagentes .....	83

5.2.2	Produtos de reações com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	84
5.2.3	Efeito de açúcares redutores .....	84
5.2.4	Efeito de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e ácido gálico .....	84
5.2.5	Estado redox de TtLPMO9H .....	84
5.3	Resultados .....	85
5.4	Discussão .....	96
6	Conclusão .....	99
	Referências .....	101
	Apêndice A - Métodos para medir atividade de LPMOs .....	115
	Apêndice B – Resultados complementares de caracterização de TtLPMO9H .....	119
	Apêndice C – Sítio catalítico de TtLPMO9H .....	123



# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A sociedade contemporânea é dependente de recursos fósseis para produção de combustíveis e de matérias-primas para a indústria química. A utilização desse tipo de recurso tem diversas desvantagens, como a finitude e o impacto imposto ao meio ambiente; além disso, é fonte de constantes preocupações políticas.<sup>1</sup> Apesar dessas preocupações, a demanda por recursos fósseis não deixa de aumentar. A biomassa é vista como uma alternativa renovável viável para suprir a demanda por matéria-prima rica em carbono. Mais especificamente, a lignocelulose (que compõe a parede vegetal) é considerada matéria-prima para produção de biocombustíveis e produtos bioquímicos. Para ser aproveitada, a biomassa lignocelulósica, que é um substrato complexo, deve ser primeiramente reduzida a suas unidades primordiais<sup>1-2</sup>

No entanto, a lignocelulose é um substrato complexo. Os três principais componentes da lignocelulose são: celulose, hemiceluloses e lignina. A celulose é um polímero homogêneo de D-glicoses ( $(C_6H_{10}O_6)_n$ ), conectadas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4. Por sua vez, hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos, ramificados e compostos, em maior parte, por combinações de monômeros de D-xilose, D-arabinose, D-manose, D-galactose e D-glicose, dentre muitos outros.<sup>3</sup> Quando decompostos aos seus monossacarídeos, celulose e hemicelulose podem ser fermentados para produção de biocombustível. O terceiro componente importante da biomassa vegetal é a lignina, um polímero heterogêneo aromático (não é um carboidrato). Os principais monolignóis que compõem a lignina são álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico.<sup>4</sup> A lignina também tem sido usada com finalidades biotecnológicas.<sup>5</sup>

Enquanto a composição homogênea e o tipo único de ligação tornam a celulose um polímero simples, essas características também resultam em estrutura extremamente resistente e de hidrólise dificultada. Em pH neutro, a meia-vida das ligações glicosídicas da celulose é de 5 milhões de anos (sem catálise). A celulose forma microfibras que se organizam em redes cristalinas de difícil acesso.<sup>6</sup> Apesar disso, muitos microrganismos utilizam a celulose como fonte energética. Muitas espécies fúngicas desenvolveram um arsenal enzimático capaz de decompor celulose, hemicelulose e lignina de forma

extremamente eficiente, e utilizá-los como fonte de carbon. A biotecnologia utilizou esses microrganismos para o desenvolvimento de coquetéis de celulases.

## 1.2 DEGRADAÇÃO DA CELULOSE

De forma generalizada, na degradação enzimática da celulose três tipos principais de enzimas são necessários e bem caracterizados: endoglucanases (EGs), celobiohidrolases (CBHs) e  $\beta$ -glicosidases. Endoglucanases são enzimas que clivam as cadeias celulósicas em regiões amorfas (regiões nas quais as microfibras de celulosa foram distorcidas), enquanto celobiohidrolases atuam de forma processiva a partir dos terminais das cadeias celulósicas, liberando unidades dissacarídicas. Por fim,  $\beta$ -glicosidases clivam celo-oligossacarídeos em monossacarídeos.<sup>6</sup>

Esses três tipos de enzimas são hidrolases, e são classificadas em famílias de hidrolases de glicosídeos (GHs) no banco de dados Carbohydrate Active Enzymes (CAZy). Em 2010, foi mostrado que enzimas da então família GH61, eram capazes de potencializar a atividade de um coquetel celulósico comercial.<sup>7</sup> Publicações subsequentes mostraram que as enzimas pertencentes à família GH61 não eram hidrolases de glicosídeos, mas sim enzimas que atuavam de forma oxidativa na clivagem de polissacarídeos, completamente distintas do que era conhecido até então.<sup>8</sup> As enzimas mencionadas estão ilustradas na Figura 1.

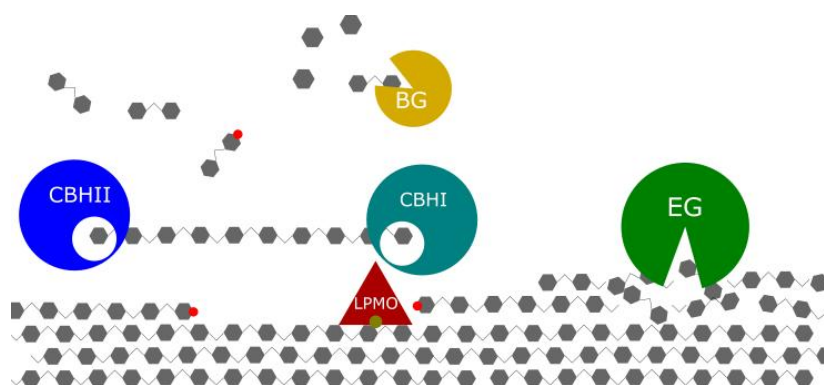


Figura 1 – Representação básica de como as enzimas atuam sobre a celulose. Os hexágonos em cinza representam os monômeros de glicose da cadeia de celulose. Endoglucanases (EG) clivam aleatoriamente as cadeias em regiões amorfas, enquanto celobiohidrolases (CBH) atuam de forma processiva ao longo da cadeia. CBHI inicia da extremidade redutora (extremidade da cadeia na qual o carbono anomérico da glicose está livre), enquanto CBHII inicia da extremidade não redutora.  $\beta$ -glicosidases (BG) clivam os celo-oligossacarídeos solubilizados pela ação das outras enzimas. LPMOs, por mecanismo oxidativo, clivam aleatoriamente as cadeias de celulose. Os pontos vermelhos em alguns hexágonos indicam oxidações introduzidas pela LPMO.

Fonte: Elaborada pela autora.



Com a descoberta da atuação oxidativa sobre os polissacarídeos, as enzimas pertencentes às famílias GH61 e CBM33 (que aumentava atividade de quitinases<sup>9</sup>) passaram a ser denominadas monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), e reclassificadas em novas famílias, de atividade auxiliar (AAs), AA9 e AA10, respectivamente.<sup>10</sup> Desde então foram descobertas outras famílias de LPMOs, e muito foi aprendido sobre sua ação e como lidar com esse tipo de enzima.

### 1.3 MOTIVAÇÃO

Retomando, para o aproveitamento da lignocelulose é necessário que os processos de degradação dessa matéria-prima sejam eficientes, e isso inclui a otimização da utilização das enzimas que atuam sobre a biomassa lignocelulósica. Apesar dos grandes avanços nos conhecimentos sobre essas enzimas, na última década foi descoberto um tipo de enzima completamente novo, enfatizando que ainda faltam conhecimentos fundamentais a respeito da desconstrução da biomassa por microrganismos.

Os conhecimentos a respeito das LPMOs vêm sendo acumulados rapidamente, muitas questões ainda necessitam ser elucidadas. Entre elas, por exemplo, ainda não se sabe quais os determinantes de região-seletividade e especificidade, função biológica, interações com outras enzimas, ou mesmo o mecanismo catalítico. Além disso, existem questões a respeito do arsenal de LPMOs que alguns organismos secretam (certos organismos codificam mais LPMOs do que celulases), muitas vezes ao mesmo tempo, e a interação delas com hidrolases e oxidoredutases. Portanto, o estudo a respeito das LPMOs é fundamental (e continuará sendo por alguns anos).

No trabalho de doutorado desenvolvido, uma LPMO fúngica de *Thermothelomyces thermophilus* (antes *Myceliophthora thermophila*) foi investigada quanto às suas características, funcionamento e ativação por diferentes sistemas.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 HISTÓRICO

Em publicação de 1950, Reese *et al.*<sup>11</sup> em estudo sobre utilização de celulose como fonte de carbono por microrganismos, postulou a existência de dois tipos de enzimas que atuavam na celulose: uma enzima, “C<sub>1</sub>”, produzida por todos os organismos celulolíticos e por alguns não-celulolíticos, responsável pelo ataque a parte cristalina da cadeia de celulose, e de enzimas “C<sub>x</sub>” que atuavam na hidrólise da celulose a cadeias mais curtas (EGs e CBHs).<sup>6</sup> Algumas décadas mais tarde, em 1974, Eriksson *et al.*<sup>12</sup> relatou a descoberta de uma enzima que oxidava celulose, e cuja ação resultava em o dobro de degradação por uma mistura de EGs e CBHs.

No entanto, progresso na área começou somente em 2005, quando foi publicado um estudo que mostrava que a proteína não hidrolítica CBP21 de *Serratia marcescens*, da família CBM33, era essencial na degradação de quitina por quitinases.<sup>9</sup> Cinco anos depois, em 2010, situação similar foi descrita para celulose, quando foi descoberto que proteínas de *Thielavia terrestris* que sozinhas não tinham poder de hidrólise, apresentavam atividade de celulases em palha de milho pré-tratada.<sup>7</sup> Os pesquisadores identificaram que as enzimas responsáveis por esse *boost* na atividade de GHs eram GH61s. A atividade quase nula em celulose pura foi uma pista, mas a determinação da estrutura da primeira GH61 foi de extrema importância. As estruturas de *TrGH61B*<sup>13</sup> (primeira) e *TrGH61E*<sup>7</sup> mostraram que provavelmente GH61s não eram hidrolases. As enzimas apresentaram estruturas muito diferentes das hidrolases, com um sítio catalítico exposto ao solvente, e com íon metálico coordenado por histidinas conservadas.<sup>13</sup> Foi notado também que a estrutura e posicionamento de tirosinas lembrava o posicionamento desses aminoácidos em CBM1s, sugerindo que GH61s se ligavam à celulose de forma parecida.<sup>7</sup> Também foi observada a similaridade entre as estruturas de GH61s e CBP21,<sup>13</sup> que tinha sido determinada ainda em 2005.<sup>14</sup>

Ainda em 2010, foi mostrado que a proteína CBP21 era na realidade uma enzima oxidativa, cujos produtos identificados carregavam terminais oxidados, e que a atividade era dependente de oxigênio molecular e da presença de agentes redutores.<sup>8</sup> Além disso, os autores do estudo propuseram que o mecanismo de GH61s poderia ser o mesmo que o de CBP21.

Em 2011, foi identificado que um cofator redox era necessário para a atividade de GH61s e que tal cofator poderia ser ácido gálico.<sup>15</sup> Também de importância, foi identificado que o íon metálico naturalmente presente na enzima era cobre.<sup>15-17</sup> No mesmo ano, foi proposto que a enzima celobiose desidrogenase (CDH), da família AA3, seria a doadora natural de elétrons para a redução de LPMOs.<sup>16</sup> Além disso, foi mostrado que os produtos formados pelas LPMOs eram ácidos aldônicos (resultado de oxidação em carbono C1)<sup>18</sup> e 4-ceto açúcares (oxidação em carbono C4),<sup>16, 19</sup> e que as enzimas tinham região-seletividades diferentes. Foi a primeira publicação a propor que GH61s fossem chamadas de “mono-oxigenases de polissacarídeos” (PMOs).<sup>16</sup>

Em 2013, o banco de dados CAZy introduziu uma nova categoria de enzimas, AA, para agrupar LPMOs (GH61s e CBM33s) e enzimas redox ativas em lignina.<sup>20</sup> As LPMOs foram inicialmente reclassificadas em duas famílias: as LPMOs que eram pertencentes a família GH61 passaram a ser AA9, enquanto as pertencentes a CBM33 passaram a ser AA10.<sup>20</sup>

## 2.2 FAMÍLIAS DE LPMOS

Atualmente, com base nas sequências de aminoácidos, LPMOs estão classificadas em oito famílias CAZy. A seguir, algumas características de cada uma das famílias, sendo AA9 e AA10 as mais estudadas:

AA9: Abriga LPMOs de fungos filamentosos. Muitas espécies fúngicas carregam em seu genoma múltiplos genes codificantes para AA9s; algumas possuem mais de 25 (*Podospora anserina*, *Coprinopsis cinerea*), como identificado desde o início por Harris et al.<sup>7</sup> Além de domínio catalítico, é comum que enzimas pertencentes a esta família possuam CBMs. Tanta variedade de genes em uma única família é intrigante e sugere múltiplas funções e substratos. O principal substrato identificado é a celulose, mas atividade também é frequentemente detectada com xiloglucan. Outras hemiceluloses como xilano também já foram apontadas como substratos de algumas AA9s. Os produtos das LPMOs desta família podem ser oxidados no carbono C1 ou/e carbono C4.

AA10: Os membros caracterizados até o momento, em sua maior parte, são de origem bacteriana. Mas também foram identificadas em um eucarioto e vírus. O membro CBP21 foi o primeiro a ser mostrado como capaz de aumentar atividade de hidrolases.

Quitina e celulose são os substratos identificados. Os membros dessa família têm régio-especificidade para C1 (com celulose ou quitina) ou C1/C4 (somente com celulose).

AA11: Esta família foi estabelecida em 2014,<sup>21</sup> e até o momento possui somente um membro caracterizado. Suas sequências integrantes são quase que totalmente de origem fúngica. O membro conhecido, *AoAA11*, atua especificamente em quitina, com especificidade C1/C4.

AA13: Ainda em 2014, Vu *et al.*<sup>22</sup> expandiu a gama de substratos das LPMOs, e introduziu uma nova família. Esta nova família, até o momento, abrange somente enzimas de fungos ascomicetos, e é ativa em amido. Até o momento, somente oxidação em C1 foi comprovada.

AA14: Em 2018, a família AA14 foi estabelecida, e os membros caracterizados mostraram-se específicos para xilano ligado a celulose. Todos os membros incluídos nessa família são de fungos. Os autores notaram que a superfície de interação com substrato da enzima caracterizada não era tão planar, como comumente observado nas AA9s. Foi mostrado que AA14 agia em sinergismo com xilanase na liberação de xilo-oligossacarídeos, e formação de xilo-oligossacarídeos oxidados foi comprovada.<sup>23</sup>

AA15: Ainda em 2018, foram identificadas, em um inseto, LPMOs distintas das até então classificadas. Outros invertebrados e algas também possuem LPMOs pertencentes a esta família, sendo que alguns podem ter várias sequências, como acontece com alguns fungos. Até o momento foram identificadas atividades em celulose e quitina, com oxidação em C1.<sup>24</sup>

AA16: Em 2019 a família AA16 foi estabelecida, com sequências majoritariamente fúngicas. Uma única enzima foi caracterizada até o momento, ativa em celulose, e de especificidade para oxidação em C1, mas a maior parte de seus produtos são oligossacarídeos nativos, distinto do que é observado em AA9s com mesma régio-especificidade). Além disso, a LPMO caracterizada não conseguiu utilizar elétrons doados por uma CDH testada, diferentemente de outras LPMOs avaliadas até o momento.<sup>25</sup>

AA17: As sequências pertencentes a esta família são de eucariotos, e as enzimas caracterizadas são de oomicetos fitopatógenos. A estrutura determinada tem diferenças em comparação com LPMOs de outras famílias. As enzimas caracterizadas mostraram atividade

em homogalacturano, restrição quanto aos aceptores de elétrons, e produtos oxidados em C4.<sup>26</sup>

Novas famílias são criadas para agrupar sequências quando ao menos uma enzima é identificada e tem características bioquímicas publicadas.<sup>27</sup> Levando em consideração o rápido acúmulo de dados genômicos e o avanço de métodos bioinformáticos, pode-se esperar que o número de famílias continue aumentando.

## 2.3 ESTRUTURA GERAL

A determinação das primeiras estruturas de GH61 tiveram um grande impacto, pois revelaram o quão distintas eram das estruturas conhecidas de celulasas.<sup>7, 13</sup> A similaridade entre as estruturas de uma CBM33 de *Serratia marcescens*<sup>14</sup> e de uma GH61 de *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*),<sup>13</sup> assim como a presença de íon metálico no centro catalítico, foram dois dos fatores que levaram à conclusão de que essas duas famílias de enzimas tinham o mesmo tipo de atividade.

Apesar das sequências primárias possuírem grande variação, de maneira geral, todas as LPMOs possuem núcleo de sanduíche- $\beta$ , e têm sítio catalítico exposto ao solvente. O sítio catalítico tem um íon cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) coordenado por duas histidinas conservadas, sendo uma delas a histidina N-terminal.<sup>15</sup> Em fungos, a histidina N-terminal sofre modificação pós-traducional, e carrega uma metilação em N $\epsilon$ .<sup>15</sup> A presença dessa metilação foi relacionada à proteção da enzima contra auto-oxidação.<sup>28</sup>

A diversidade estrutural das LPMOs se encontra em hélices e loops que conectam as fitas- $\beta$ , e que compõem a superfície de interação com o substrato,<sup>29</sup> que tem similaridade com a estrutura de CBM1. Em AA9s, a superfície de interação com o substrato é relativamente plana, com resíduos aromáticos para ligação ao substrato. Mesmo dentro de uma mesma família existe grande variação nos aminoácidos expostos ao solvente (mesmo próximo ao sítio catalítico) e na topologia, o que sugere que as LPMOs possuem especificidades e região-seletividades distintas.<sup>29</sup> Na Figura 2, estão representadas as estruturas de LPMOs com diferentes região-seletividades.

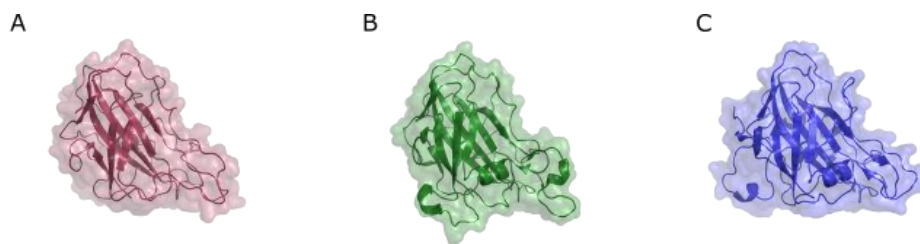


Figura 2 - Estrutura representativas de AA9s de acordo com régio-seletividade A, LPMO com atividade em C1 (3EII, de *T. terrestris*). B, LPMO com atividade em C4 (4D7U, de *N. crassa*); e LPMO com atividade em C1 e C4 (5O2W, de *H. jecorina*). Na representação, a superfície de interação com o substrato está para baixo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar dos esforços na correlação entre estrutura e especificidade de substrato/régio-seletividade, e da clara diferença entre as superfícies das LPMOs, ainda não há consenso a respeito dos determinantes estruturais para essas características.<sup>29-32</sup>

Com frequência, LPMOs têm seus módulos catalíticos associados a CBMs, o que influencia na afinidade, especificidade pelos substratos,<sup>34-35</sup> e até mesmo na regioespecificidade.<sup>35-36</sup> Esta, por sua vez, influencia na estabilidade das LPMOs, tendo em vista que a ligação ao substrato “protege” a enzima de danos oxidativos.<sup>35-38</sup> Em fungos, o *linker* que conecta os domínios frequentemente possui modificações pós-traducionais na forma de glicosilações tipo N- e O-, que podem proteger contra proteases, afetar estabilidade e afinidade de ligação aos substratos.<sup>40-41</sup> Curiosamente, uma estrutura revelou uma LPMO na qual parte do *linker* é estruturado, enrolado no domínio catalítico;<sup>41</sup> no entanto, não foi ainda revelada as consequências de ter linker como parte do domínio catalítico. Também são encontradas sequências de onde o módulo catalítico está associado à um ou mais módulos cujas funções não foram esclarecidas até o momento,<sup>29, 37</sup> o que indica que LPMOs podem ter papel além da degradação de carboidratos.

## 2.4 SUBSTRATOS

A presença de múltiplos genes que codificam para LPMOs em um mesmo organismo, e a co-secreção de LPMOs em determinadas condições sugerem que as LPMOs possuem funções distintas, com especificidades distintas.

Celulose pode ocorrer em diferentes formas cristalinas, recalcitrantes, com pouco conteúdo de água (insolúveis).<sup>6</sup> A estrutura de LPMOs, com sítio ativo superficial e superfície de ligação ao substrato planar,<sup>42</sup> é ideal para ação nesses substratos, ao contrário de GHs, que

necessitam de cadeias isoladas para atividade eficiente. AA9 LPMOs possuem aminoácidos aromáticos<sup>7, 43</sup> para ligação ao substrato, sendo que a distribuição desses aminoácidos pode estar em linha, com distâncias que equivalem às distâncias das unidades de glicosídeos em cadeia celulósica.<sup>43</sup> As LPMOs que atuam em celulose geram oxidações nos carbonos C1 e/ou C4. Outros substratos recalcitrantes já identificados são quitina (família AA10<sup>8</sup>, AA11<sup>21</sup> e AA15<sup>24</sup>) e amido (família AA13)<sup>22</sup>

Foram identificadas também LPMOs que agem em celo-oligossacarídeos solúveis. A primeira LPMO a ser demonstrada como ativa em celo-oligossacarídeos foi *NcLPMO9C*, sendo ativa em celohexaose, celopentaose e celotetraose,<sup>44</sup> e desde então essa atividade foi observada em outras LPMOs.<sup>45</sup> Apesar disso, foi mostrado que a afinidade por polissacarídeos é maior do que por oligossacarídeos, sugerindo que estes últimos não são os substratos naturais dessa enzima.<sup>33</sup> Embora a importância dessa atividade na natureza não tenha sido esclarecida, a ação em oligossacarídeos solúveis é muito vantajosa para o estudo de interações entre LPMOs e substratos.

Além dos substratos cristalinos e insolúveis, certas LPMOs são ativas em hemiceluloses. Várias LPMOs são ativas tanto em celulose quanto hemicelulose. Entre as hemiceluloses, xiloglucano é a mais “popular” entre as LPMOs até o presente.<sup>32, 45-49</sup> Outras hemiceluloses já identificadas como substratos de LPMOs são glucomanano,  $\beta$ -glucano de ligação mista, e liquenan.<sup>50</sup> A especificidade da oxidação e clivagem depende da LPMO, sendo que algumas toleram substituições e outras não.<sup>32</sup> Outra atividade interessante é a de *McAA9A*, que cliva diferentes substratos hemicelulósicos, mas tem preferência por xilano. Os autores ressaltam a importância da conformação do xilano, que se deposita cobrindo a celulose;<sup>51</sup> Foi relatado, por exemplo, que *MtLPMO9A* só tem atividade em xilano quando este está associado à celulose.<sup>52</sup>

Alteração da especificidade de substratos, de celulose para quitina, foi obtida por mutações de aminoácidos na superfície de interação com o substrato de uma LPMO pertencente à família AA10. No entanto, os autores observaram que as mutações que permitiram a mudança de especificidade não foram suficientes manter a enzima com atividade equivalente à não mutada, provavelmente pelo papel de outras regiões na manutenção da ligação com o substrato.<sup>53</sup>



O substrato parece influenciar ainda nos produtos liberados. Foi observado, por exemplo, variação no grau de polimerização dos celo-oligosacarídeos liberados dependendo do tipo de celulose usada como substrato das AA9s.<sup>54</sup>

## 2.5 RÉGIO-ESPECIFICIDADE

LPMOs podem oxidar o carbono C1 (terminal redutor) e/ou o carbono C4 (terminal não redutor) do resíduo da cadeia de polissacarídeo (Figura 3). Oxidação no carbono C1 elimina o terminal redutor. O produto formado é uma lactona, que em solução aquosa, espontaneamente hidrata à ácido aldônico (Figura 3A).

A oxidação no carbono C4 foi provada indiretamente por meio de modificação química,<sup>19</sup> e diretamente por espectrometria de massa (oxidações em C1 e em C4 resultam em fragmentos diagnósticos) e ressonância magnética nuclear.<sup>44</sup> Oxidação no carbono C4 resulta em ceto-aldose que, em solução, fica em equilíbrio com a forma gemdiol (Figura 3B).

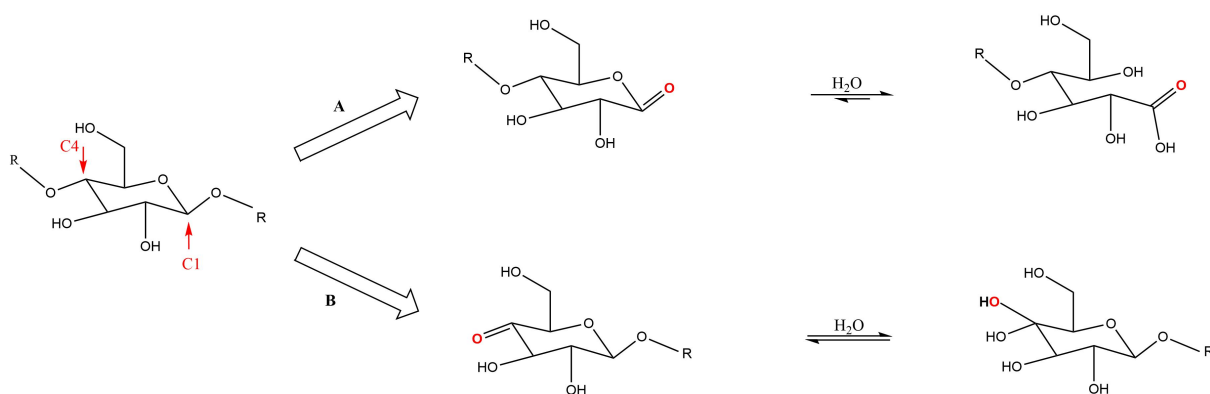


Figura 3 - Produtos de oxidação por LPMO As oxidações podem ocorrer nos carbonos C1 ou C4, indicados por setas vermelhas. Em A, o produto de oxidação em C1, lactona, que é hidratado a ácido aldônico. Em B, o produto de oxidação em C4, ceto-aldose, que permanece em equilíbrio com a forma gemdiol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Certas LPMOs atuam somente no carbono C1 ou no carbono C4. Outras LPMOs, no entanto, conseguem atuar nos dois carbonos gerando, portanto, produtos duplamente oxidados, além de produtos nativos não oxidados.

É interessante notar que a régio-especificidade parece depender do substrato. Somente para celulose foram identificadas LPMOs que oxidam tanto em C1 quanto em C4. Em outros substratos (quitina, amido, xilano) somente oxidações no carbono C1 foram reportadas.<sup>55</sup>

Assim como a especificidade de substratos, a região-seletividade também está relacionada aos loops que formam a superfície de interação com o substrato. Alguns estudos de mutagênese foram capazes de alterar a atividade. Uma AA9 originalmente com atividade C1/C4 perdeu a atividade C4 após a remoção de um loop naturalmente ausente em LPMOs que oxidam somente C1.<sup>56</sup> É muito curioso, no entanto, que LPMOs que atuam somente em C4 também não possuem esse loop. Eliminação de atividade em C4 também foi obtida para uma AA10.<sup>57</sup>

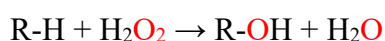
Oxidação no carbono C6 também foi sugerida.<sup>16,59-60</sup> É mais difícil de ser provada e têm mesma massa que o produto oxidado em C4. Inicialmente suspeitava-se que oxidações ocorriam em C6 por ser o carbono mais exposto; no entanto, oxidações nesse carbono não causariam a quebra da cadeia polimérica. Ainda assim, alguns grupos propuseram oxidação em C6, pois oxidação nesse carbono explicaria dados de espectrometria de massa, que poderiam corresponder a múltiplas oxidações nos produtos detectados.<sup>60</sup> Alguns argumentos a favor da oxidação em C6 são a maior estabilidade de açúcares 6-cetal em comparação com 4-ceto, promovido em condições ácidas, e a estabilização no ambiente.<sup>59</sup>

## 2.6 OXIGÊNIO VS PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Com a descoberta do mecanismo oxidativo das LPMOs, que resulta na formação de oligossacarídeos com terminais oxidados, pesquisadores concluíram que O<sub>2</sub> era a fonte do oxigênio presente no produto oxidado.<sup>8</sup> Baseado em mono-oxigenases de cobre, foi proposto um mecanismo químico de ação da LPMO.<sup>16</sup> De acordo com o proposto, as reações aconteceriam da seguinte forma:



No entanto, outro mecanismo foi proposto em 2017, segundo o qual LPMOs não dependiam de O<sub>2</sub>, mas sim de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>36</sup> Os pesquisadores mostraram que LPMOs eram mais eficientes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que com O<sub>2</sub>, com valores catalíticos mais similares aos de peroxidases. De acordo com a nova proposta, as reações aconteceriam da seguinte forma:



As atividades anteriormente observadas, com O<sub>2</sub>, seriam resultado de vias alternativas que levavam à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como a reação entre ácido ascórbico e íons cobre em solução<sup>61</sup> ou LPMO-Cu(I) e O<sub>2</sub>.<sup>62</sup>

Além de fornecer o oxigênio presente no produto final oxidado,  $H_2O_2$  pode também re-oxidar LPMO-Cu(I) a LPMO-Cu(II).<sup>63</sup> De acordo com os eventos propostos, o ciclo começaria com a LPMO-Cu(II) sendo reduzida a LPMO-Cu(I), e então se ligando ao substrato. Já ligados,  $H_2O_2$  se difunde até o sítio de reação. A ligação glicosídica é clivada, e a enzima, dissociada do substrato. LPMO-Cu(I) pode seguir para novo ciclo, ou ser re-oxidada por  $H_2O_2$ ; excesso de  $H_2O_2$  no entanto, pode resultar em inativação da enzima.<sup>63</sup>

No entanto,  $H_2O_2$  tem desvantagens: em altas concentrações, inibe a reação das LPMOs, através da inativação enzimática, e a combinação de  $H_2O_2$  e redutor pode inativar a enzima em segundos.<sup>64</sup>

Apesar das evidências acumuladas que confirmam o papel de  $H_2O_2$ , a natureza do co-substrato real ainda é polêmica. Enquanto alguns estudos apontam LPMOs que somente possuem atividade peroxigenásica, como *AfAA11B*,<sup>65</sup> outros pesquisadores argumentam que tanto  $O_2$  quanto  $H_2O_2$  podem ser co-substratos, sendo dependente das condições de reação, como a concentração do substrato sacarídico.<sup>66</sup> Além disso, o co-substrato pode estar relacionado ao tipo de produto (oxidado ou não) da LPMO, como sugerido em publicação recente. De acordo com os autores, a clivagem da cadeia polissacarídica depende de  $H_2O_2$ , enquanto a oxidação depende de  $O_2$ .<sup>67</sup>

A dependência de  $H_2O_2$  e consequências das reações diretas e vias alternativas que geram/consomem  $H_2O_2$ , têm também efeitos na aplicação de LPMOs em escala industrial, que, portanto, requer rígido controle do agente redutor e de  $H_2O_2$ .<sup>68</sup>

## 2.7 REDUÇÃO DE LPMO POR PEQUENAS MOLÉCULAS

Inicialmente, quando foi mostrado que LPMOs eram capazes de aumentar a atividade de celulasas em biomassas pré-tratadas, mas não em substratos puros, os pesquisadores se perguntaram o porquê desse comportamento. A resposta veio quando, dos componentes solúveis do líquido de palha de milho pré-tratada, foi identificado que o ácido gálico era capaz de ativar a enzima.<sup>15</sup>

Em seu estado inativo, LPMOs permanecem na forma LPMO-Cu(II); a redução por um elétron é necessária para a mudança para LPMO-Cu(I), forma ativa desta enzima.

Atualmente foram identificadas múltiplas moléculas capazes de doar elétrons para LPMOs, e a eficiência de redução varia bastante entre LPMOs. A maioria das LPMOs

estudadas até o momento podem ser reduzidas por múltiplos agentes redutores. A lignina, naturalmente presente na biomassa, é um reservatório de elétrons que podem ser aproveitados por LPMOs.<sup>69</sup> Em geral moléculas fenólicas que possuem dois ou três hidroxilas, tendem a ser preferidas.<sup>50,71-72</sup> Outras moléculas bastante distintas como glutatona e cisteína também funcionam na ativação de algumas LPMOs (Figura 4). Na literatura acumulada, o ácido ascórbico tem sido o agente redutor utilizado com maior frequência. No entanto, nos últimos anos tem ficado cada vez mais claro que a utilização de ácido ascórbico resulta em outros eventos independentes da enzima e devem ser levados em consideração no uso desse agente e interpretação dos resultados.<sup>61</sup>

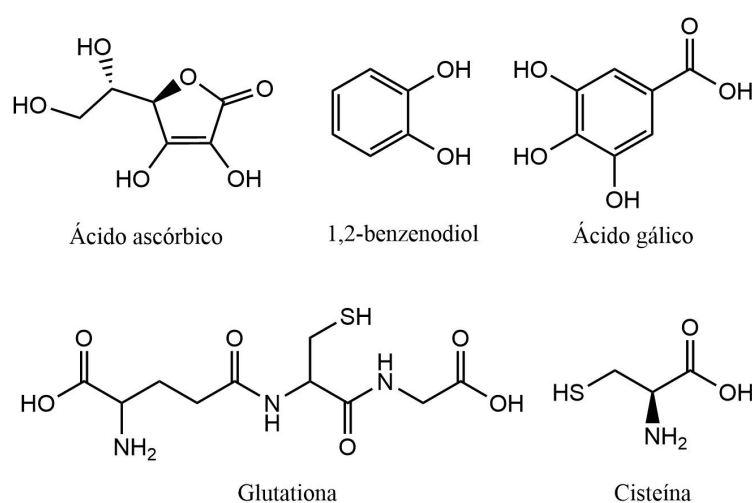


Figura 4 - Agentes redutores de LPMO. Exemplos da variedade de moléculas que foram identificadas como doadoras de elétrons para LPMOs.

Fonte: Elaborada pela autora.

Múltiplos fatores influenciam na eficiência de um agente redutor. As condições de reação alteram o pH (e o potencial redutor),<sup>72</sup> a estabilidade da molécula, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reações paralelas. A LPMO é afetada, e certas condições de reação podem inativar LPMOs em alguns segundos. Um outro fator é estrutural, com mudança na coordenação do cobre em pHs ácidos.<sup>73</sup> Além disso, a eficiência parece depender também do substrato, sendo que com certos substratos, a LPMO não é sensível a diferentes redutores.<sup>32</sup>

Não é claro como ou em qual momento a redução ocorre. Quando ligada ao substrato, o sítio catalítico da LPMO é quase inacessível,<sup>33,74-75</sup> o que sugere transferência de elétrons a longa distância,<sup>43</sup> ou que a LPMO é primeiramente reduzida e depois se liga ao

substrato. O fato de que a afinidade ao substrato aumenta após redução<sup>76-77</sup> favorece essa ideia.

É importante ressaltar que a redução pode não ser produtiva, no sentido de não resultar em produtos oxidados. LPMOs reduzidas, quando não ligadas a um substrato, podem reduzir O<sub>2</sub>, e assim, gerar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (atividade de oxidase).

O consumo de agente redutor depende de que tipo de reação é considerada. Enquanto na reação mono-oxigenásica é necessária uma redução para gerar um produto oxidado, em reação peroxigenásica um único evento de redução (*priming*) parece ser suficiente para vários ciclos catalíticos; portanto, agentes redutores são necessários em quantidades subestequiométricas.<sup>36</sup>

## 2.8 RELAÇÃO ENTRE LPMOS E OUTRAS ENZIMAS AUXILIARES

Além de pequenas moléculas, enzimas também podem atuar como doadoras de elétrons, sendo CDHs as mais conhecidas. Muitas funções foram propostas para CDHs, mas para a maioria delas não existem evidências diretas. Em 2011, foi proposto que CDH poderia ser o doador de elétrons natural das LPMOs em fungos, após mostrar que as duas enzimas agiam em conjunto.<sup>16,77</sup>

CDHs possuem dois domínios: um domínio flavodesidrogenase (DH, que possui grupo FAD, e, portanto, pertence à superfamília GMC) e um domínio citocromo (CYT, com grupo prostético heme b), conectados por um *linker* longo e flexível que permite a transferência de elétrons entre os domínios.<sup>78</sup> A reação catalisada por CDH acontece em duas etapas. Na primeira, o FAD é reduzido, com a oxidação de celobiose a celobionolactona. Em seguida ocorre a transferência de elétron para o domínio CYT. Deste domínio, por transferência entre proteínas, o elétron pode reduzir o cobre da LPMO.

Inicialmente<sup>57</sup> foi proposto que CDHs interagem com LPMOs em uma região superficial conservada levemente hidrofílica e por transferência de longo alcance, o elétron chegaria ao sítio catalítico.<sup>43</sup> No entanto, estudos subsequentes demonstraram que a redução por CDH ocorre pela interação entre o grupo heme b do CYT e o cobre da LPMO, na mesma superfície que se liga ao substrato, ou seja, ao redor do sítio catalítico.<sup>74, 79</sup> Isso implica que, quando a LPMO se liga ao substrato, ela já deve possuir os elétrons a serem usados.<sup>74, 80</sup>

A ativação de LPMOs pelos domínios independentes da CDH são contraditórias. Enquanto alguns estudos somente obtiveram transferência de elétrons entre o domínio CYT e LPMO,<sup>79, 81</sup> outros mostraram que o domínio citocromo não era essencial. A redução de LPMO foi observada com somente o domínio DH de CDH, e na ausência de um outro redutor como ácido ascórbico.<sup>81</sup>

Apesar de CDHs funcionarem quase que universalmente com LPMOs (uma única exceção foi reportada<sup>25</sup>), a realidade é que somente fungos possuem CDHs; e mesmo entre os fungos, CDHs não são universais. Este fato levanta a questão de se ou quais outras enzimas poderiam atuar como parceiros enzimáticos das LPMOs.

Um grupo lógico para buscar possíveis enzimas é a família na qual CDHs estão classificadas, a família AA3 no CAZy, e a superfamília GMC. De fato, existe correlação positiva entre genes *gmc* e *lpmo*.<sup>70</sup> No entanto, a forma como a enzima auxiliar atua difere entre os estudos publicados. Enquanto CDHs reduzem diretamente as LPMOs, outras GMCs (que possuem somente FAD como cofator) participam de forma indireta, reciclando as moléculas fenólicas que servem como agentes redutores para LPMOs.<sup>70</sup> Outro estudo afirma que GMCs podem participar de transferência direta de elétrons.<sup>82</sup>

AAOQs (aril-álcool quinona oxidoredutases) e AAO (aril-álcool oxidases) foram investigadas como potenciais doadoras de elétrons para LPMOs.<sup>82</sup> Estas duas enzimas são vantajosas para estudo pois seus substratos são distintos dos substratos e produtos das LPMOs, ao contrário de CDH, por exemplo, o que facilita a interpretação dos resultados. Similar ao observado com pequenas moléculas, algumas LPMOs podem ser ativadas e outras não. Enquanto AAOQ1 foi capaz de ativar a LPMO avaliada, a adição de AAO não resultou em produtos de LPMO. GDH (glicose desidrogenase) também já foi avaliada. Os autores do estudo relacionaram os resultados observados com a afinidade das enzimas por oxigênio: desidrogenases funcionaram, enquanto oxidases estritas, não.<sup>82</sup>

Outra enzima investigada foi CcPDH, piranose desidrogenase dependente de pirroloquinolina quinona, proteína multimodular da família AA12. Foi demonstrado que o domínio AA12 sozinho não era suficiente, e o domínio CYT (AA8) era necessário para a formação de produtos oxidados pela LPMO.<sup>83</sup> A redução por um tipo de citocromo bacteriano foi também relatada com duas LPMOs bacterianas.<sup>84</sup>

Foi interessante também a utilização de uma enzima que modifica o agente redutor da LPMO, alterando assim a atividade desta. MtPPO7, uma enzima polifenol oxidase,

ao introduzir mais uma hidroxila à molécula fenólica, a torna um agente redutor preferencial da LPMO.<sup>71</sup> Outras enzimas que atuam desta forma não foram ainda exploradas. Na Tabela 1, as oxidoreduções que já foram avaliadas quanto à ativação de LPMOs.

Além de redução direta das LPMOs, reciclagem e modificação de moléculas fenólicas, oxidoreduções podem contribuir para a ativação de LPMOs pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Historicamente, oxidases como as pertencentes às famílias AA3 (AAO) e AA5 (glioxal oxidase) foram associadas à degradação de lignina por peroxidases.<sup>85</sup> No entanto, após a descoberta da utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por LPMOs, vale a pena rever a atividade dessas duas enzimas. Além disso, é renovado o interesse em oxidases de açúcares, como glicose oxidase, galactose oxidase e oligossacarídeo oxidases;<sup>86</sup> CDHs também, visto que algumas têm notável afinidade por oxigênio.<sup>81</sup>

Tabela 1 - Ativação de LPMOs por sistemas enzimáticos.

Nome da enzima	Família AA	Substrato da AA	LPMO	Atividade	Observações	Ref.
<b>GOx</b>						
<b>GDH</b>	AA3	glicose	NcLPMO9C	Sim	Enzimas regeneram os mediadores redox usados pelas LPMOs.	70
<b>PDH</b>						
<b>AAQO1</b>		álcool anisílico	PaLPMO9E	Sim	AAQOs foram consideradas desidrogenases com atividade oxidase residual, enquanto AAO era uma oxidase estrita. Transferência direta de elétrons entre as enzimas.	82
<b>AAQO2</b>		álcool coniferílico	PaLPMO9E	Sim		
<b>AAO</b>	AA3	álcool anisílico	PaLPMO9E	Não		
<b>GDH</b>		glicose	PaLPMO9E	Não		
<b>GDH</b>		glicose	PaLPMO9H	Sim		
<b>MtPPO7</b>	N.A.	monofenóis	MtLPMO9B	Sim	Produtos de MtPPO7 são agentes redutores melhores.	71
<b>AnGOx</b>	AA3	glicose	ScLPMO10C	Sim	GOx como produtora de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Necessária a adição de agente redutor.	36
<b>CcPDH</b>	AA12	D-glucosona ou L-fucose	NcLPMO9F	Sim	Atividade dependente do domínio com citocromo. Transferência direta de elétrons.	83
			NcLPMO9C	Sim		
<b>FgCelDH7C</b>	AA7	nenhum ou celotetraose	PaLPMO9E	Sim	Dados indicam que ocorreu transferência direta de elétrons entre as duas enzimas	87
			PaLPMO9H	Sim		
			LsAA9A	Sim		

Fonte: Elaborada pela autora.

## 2.9 LUZ

Em 2016, foram publicados estudos que mostraram ativação da LPMO por luz. Um grupo de pesquisa inicialmente propôs um sistema no qual oxidação da água utilizando luz e mediado por vanádio-TiO<sub>2</sub> (V-TiO<sub>2</sub>) gerava os elétrons para a redução de LPMO, com a vantagem de ter O<sub>2</sub> como subproduto (na época O<sub>2</sub> ainda era visto como único co-substrato de LPMO).<sup>88</sup> Um outro grupo de pesquisa<sup>89</sup> partiu da ideia de que na natureza ocorrem reações foto catalisadas, sendo as clorofilas potentes doadores de elétrons. O estudo utilizou tilacóides e clorofilina, assim como diferentes comprimentos de luz, e notou que a atividade das LPMOs



aumentava muitas vezes na presença de pigmento e luz. De acordo com o proposto pelos autores, a LPMO era reduzida pela clorofilina excitada pela luz, e com o consumo de  $O_2$ , formava produtos oxidados. O mecanismo deduzido utilizava ainda ácido ascórbico, não para reduzir a LPMO, mas para regenerar a clorofilina. Em publicação subsequente, os autores descartaram papel de espécies reativas de oxigênio na reação de LPMO catalisada por luz, e continuaram apoiando a hipótese de que a ativação ocorria pelo pigmento excitado.<sup>90</sup>

No entanto, um estudo subsequente argumentou que o pigmento clorofilina não pode reduzir LPMO diretamente, dada a incompatibilidade dos potenciais de redução desses dois componentes.<sup>91</sup> Propôs que o agente redutor (ácido ascórbico) não é necessário, pois a luz incidente excita a clorofilina, que por sua vez, reduz  $O_2$  a  $O_2^{\cdot-}$  (que pode reduzir LPMO), que então é convertido a  $H_2O_2$ , que por fim é o co-substrato da LPMO.<sup>91</sup> Nesse sistema, o ácido ascórbico não atua na regeneração de clorofilina, mas acelera a conversão de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , acelerando a reação. O mesmo estudo retomou ainda a ativação com V-TiO<sub>2</sub> para mostrar que também neste outro sistema o fenômeno observado se devia ao  $H_2O_2$  formado.<sup>91</sup>

Seja qual for o real redutor da LPMO nos sistemas de foto-ativação, a atividade de LPMO em reações catalisadas por luz envolve muitos fatores, incluindo a quantidade de substrato, o pigmento foto-ativador utilizado, o comprimento e intensidade de luz, a penetração de luz no sistema e o tipo de iluminação (constante ou intermitente).<sup>90</sup> Todos esses fatores influenciam na produção de espécies reativas de oxigênio que geram danos oxidativos nas LPMOs, inativando-as, portanto, a aplicação de um sistema de foto ativação de LPMO necessita da otimização desses fatores.

Em resumo, até o momento foram identificadas múltiplas maneiras de reduzir LPMOs (Figura 5) e alguns dos sistemas redutores podem contribuir ainda com produção de  $H_2O_2$ . Todos esses sistemas foram avaliados somente *in vitro*. Na natureza é esperado que o sistema de redução/geração de  $H_2O_2$  variem de acordo com o estilo de vida do microorganismo.<sup>50</sup>

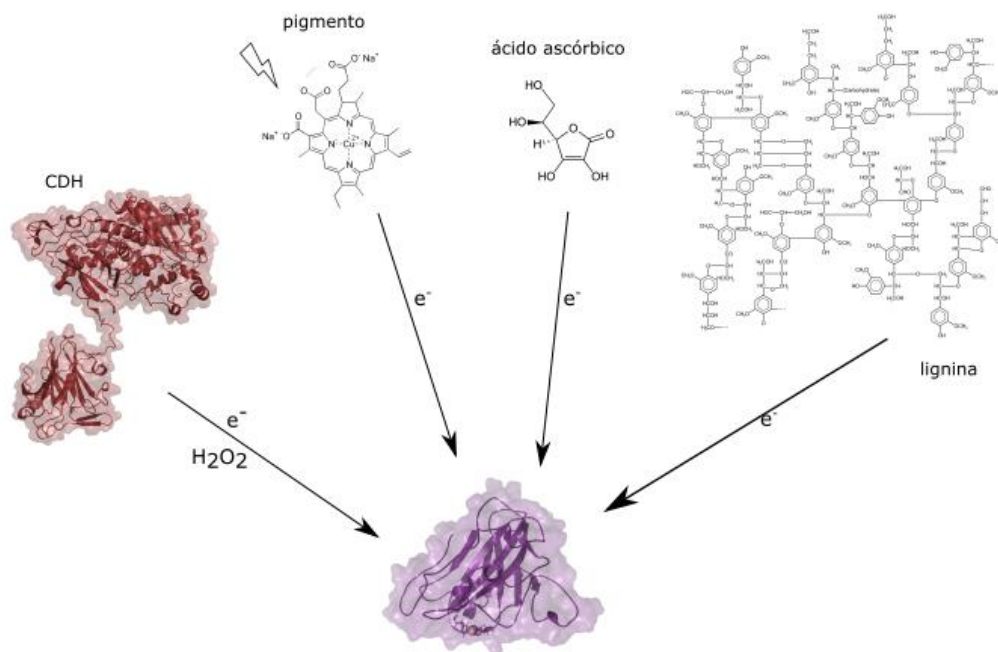


Figura 5 - Sistemas conhecidos de redução de LPMOs. Da esquerda para a direita. CDH representa os sistemas enzimáticos, que podem afetar LPMO pela doação direta de elétrons, reciclar mediadores e/ou prover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pigmentos foto-excitados podem doar elétrons diretamente e/ou gerar superóxido (e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Pequenas moléculas, como ácido ascórbico ou metabólitos vegetais doam elétrons diretamente para LPMO. Lignina é um reservatório de elétrons, e produtos de sua degradação também funcionam dessa forma.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 2.10 FUNÇÃO BIOLÓGICA

Genes que codificam para LPMOs são encontrados em fungos e bactérias que possuem maquinaria para degradação de biomassa. No entanto, a grande quantidade de LPMOs produzidas por alguns desses organismos, assim como de LPMOs associadas a outros domínios sem relação direta com degradação de biomassa, sugerem que LPMOs cumprem outras funções. Contudo, poucos estudos exploraram qual seriam essas funções.

Em *Vibrio cholerae*, uma LPMO ativa, mas não relacionada a decomposição da biomassa foi detectada. A LPMO descrita possui dois domínios cujas funções permanecem desconhecidas; os autores notaram que proteínas similares são encontradas em outras bactérias.<sup>92</sup> Uma LPMO de *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno humano, parece ter papel na virulência desta bactéria, e evasão ao sistema imune; também possui um domínio de função desconhecida.<sup>93</sup> Por outro lado, oligossacarídeos oxidados produzidos por LPMOs parecem ativar o sistema imune de *Arabidopsis*.<sup>94</sup> Participação na virulência também foi reportada para uma LPMO de *Listeria monocytogenes*.<sup>95</sup>

## 2.11 APLICAÇÕES

Por aumentarem a atividade de celulasas, LPMOs são encontradas em coquetéis enzimáticos comerciais Cellic CTec, voltados para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.<sup>96</sup> Muitos dos estudos publicados mostraram efeitos da adição de LPMOs às celulasas na hidrólise de biomassas pré-tratadas.<sup>7,16,19,43,98-99</sup>

A ação de LPMO diminui as dimensões e massa molecular das fibras de celulose pode torná-las mais suscetíveis a tratamento mecânico.<sup>99</sup> Estudos sugerem que LPMOs enfraquecem as fibras celulósicas através da modificação química (oxidação), aumentam a superfície acessível, e facilitam quebra da cadeia de celulose.<sup>100-101</sup> Por essas razões, LPMOs também estão sendo investigadas para a preparação de nano fibras de celulose.<sup>101-102</sup>

Outras LPMOs parecem não liberar produtos, mas o efeito de sua atividade é evidenciado pelo aumento da atividade de outras enzimas.<sup>103</sup> Uma LPMO desse tipo foi avaliada para degradação de PET em conjunto com PETases.<sup>103</sup>

LPMOs vêm sendo também investigadas para a funcionalização de quitina,<sup>104</sup> e oligossacarídeos,<sup>105</sup> preparação de prebióticos<sup>106</sup> e degradação de corantes.<sup>107</sup> Em resumo, LPMOs tem potencial para ampla aplicação e devem ser exploradas.



## 3 CARACTERIZAÇÃO DE TtLPMO9H E ATIVAÇÃO POR LUZ

---

### 3.1 INTRODUÇÃO

O estudo de LPMOs avançou consideravelmente desde que foram inicialmente reportadas suas atividades, em 2010. No entanto, descobertas importantes (como o papel exercido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), novas famílias e novas e intrigantes características continuam sendo relatadas com frequência. Neste capítulo é mostrada a caracterização de TtLPMO9H, quanto à bioquímica, assim como o modelo gerado a partir de dados de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

### 3.2 MATERIAIS E METODOLOGIAS

#### 3.2.1 Produção e Purificação

O gene para a enzima *TtLPMO9H* (código de referência XP\_003661787 no NCBI), de *T. thermophilus* (*Myceliophthora thermophila*) foi clonado e transformado em *Aspergillus nidulans* A773<sup>108</sup> pelo grupo coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Segato (USP – Lorena) e os transformantes foram gentilmente cedidos para estudo.

Para produção de esporos frescos, o crescimento de *A. nidulans* foi inicialmente realizado em meio mínimo sólido 10 g/L glicose, 50 ml/L solução de sais 20x (120 g/L NaNO<sub>3</sub>, 10,4 g/L KCl, 10,4 g/L MgSO<sub>4</sub>, 30,4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 ml/L elementos traço 1000x (22 g/L ZnSO<sub>4</sub>, 11 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 g/L MnCl<sub>2</sub>, 5 g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.6 g/L CoCl<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O, 1.6 g/L CuSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1.1 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 50 g/L Na EDTA), 19 g/L ágar, pH 6.5 suplementado com 10 mg/L de piridoxina. A incubação foi a 37 °C. Para expressão da enzima, foi usado meio mínimo líquido suplementado com 10 mg/L piridoxina e 3 % de maltose, e filtrado por membrana PES estéril de corte 0.22 µm (Corning). Os esporos do crescimento em meio sólido foram suspensos com meio de cultura, e misturados com todo o volume do mesmo. A suspensão foi dividida bandejas plásticas com tampa, cada uma tendo recebido 0,5 L da suspensão.

A incubação foi estática a 37 °C. Após 40 horas as bandejas foram retiradas e o tapete micelial descartado. O caldo extracelular, para o qual a enzima foi secretada, foi

centrifugado e filtrado através de membrana Miracloth (Merck) para remoção de células e *debris*. O sobrenadante foi concentrado por filtração de fluxo tangencial usando uma coluna HollowFiber de corte 5 kDa (GE Healthcare) em sistema QuixStand (GE Healthcare).

Proteínas do concentrado foram precipitadas com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (70% m/v final) em câmara fria, *overnight*, e centrifugadas a 7000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado proteico foi ressuscitado em 20 mM citrato de sódio pH 5.0 com 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e aplicado em coluna Phenyl Sepharose 26/10 (GE Healthcare). O fluxo foi 1.5 ml/min, e a eluição foi com tampão 20 mM citrato de sódio pH 5.0 com 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e gradiente com 20 mM citrato de sódio pH 5.0 ao longo de três volumes de coluna, seguido por eluição isocrática com o tampão sem sulfato de amônio. A cromatografia foi controlada por sistema ÄKTA Purifier (Amersham Pharmacia), a eluição proteica acompanhada por absorbância em 280 nm e as frações foram avaliadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 15%.

As frações correspondentes à TtLPMO9H foram reunidas e concentradas em concentradores Spin-X (Corning) com 10 kDa de *cutoff*. Em seguida, o concentrado foi incubado com três vezes a concentração molar de  $\text{CuSO}_4$  para saturação com cobre, e mantido em gelo por 30 minutos. A amostra então passou por cromatografia de exclusão molecular em coluna HiLoad 16/60 Superdex75 (GE Healthcare), em 50 mM citrato de sódio pH 5.0 com 150 mM NaCl como tampão de corrida fluxo 1 ml/min, em sistema controlado em sistema ÄKTA Purifier (Amersham Pharmacia). A pureza das frações coletadas foi avaliada por eletroforese em gel SDS-PAGE 15%. A concentração da enzima de interesse foi medida em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) usando valores teóricos de coeficiente de extinção molar  $69370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e massa molecular 33237,68 Da, obtidos com a ferramenta ProtParam.<sup>109</sup>

### 3.2.2 Análise de sequência de aminoácidos

A sequência de aminoácidos da proteína foi alinhada usando blastp (BLAST, NCBI) contra o banco de dados com sequências não redundantes e contra o pdb. Foi também avaliada quanto as famílias a que pertence no banco de dados Pfam.

Os potenciais sítios de glicosilações foram avaliados com base na sequência de aminoácidos, utilizando os servidores online NetNGlyc 1.0 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)) e NetOGlyc 4.0 Server, usando parâmetros padrão.

### 3.2.3 Thermofluor

O desenovelamento de TtLPMO9H em diversos tampões foi avaliado com a mistura de tampão (50 mM final, 300 mM NaCl, quando presente), sonda fluorescente SYPRO Orange (Invitrogen) (4x final) e LPMO (0,375 mg/ml final), em placa de PCR de 96 poços. Alterações na fluorescência foram acompanhadas em sistema CFX Real Time System (Bio-Rad). Foi realizada rampa de temperatura, que variou de 25 °C até 90 °C, em incrementos de 1 °C/min, permanecendo em cada temperatura por 30 segundos. Fluorescência foi medida com excitação em 490 nm e emissão em 530 nm.

### 3.2.4 Preparação de redutores

Soluções estoque de ácido gálico e ácido ascórbico (ambos Sigma-Aldrich) foram preparadas por dissolução em água para concentração final de 50 mM e 100 mM, respectivamente. As soluções foram alíquotadas e mantidas congeladas (-20 °C). Imediatamente antes do uso, novas alíquotas eram retiradas e descongeladas no escuro.

### 3.2.5 Atividade enzimática por produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Esquema dos métodos de quantificação de atividade no Apêndice A.

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando uma LPMO está na presença de doador de elétrons (e simultânea ausência de substrato) foi usada para medir atividade.<sup>62</sup> A mistura para reação consistiu em 1 μM LPMO, 50 mM reagente Amplex Red (Invitrogen), 7.1 U/ml horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich), em tampão 100 mM bis-tris pH 6.0. A mistura foi incubada em espectrofotômetro Synergy HTX (Biotek) em temperatura de 30 °C por dois minutos. As reações foram iniciadas com adição de 1 mM ácido ascórbico. Absorbância em 563 nm foi acompanhada ao longo de 30 minutos.

### 3.2.6 Análise de contaminantes celulolíticos

A pureza da preparação enzimática foi avaliada através da medida de atividade celulolítica, utilizando substratos sintéticos. 3 μM da preparação enzimática foi incubado com 1 mM 4-nitrofenil β-D-glucopiranosídeo (*p*NPG, Sigma-Aldrich) ou 4-nitrofenil β-D-celobiosídeo (*p*NPC, Sigma-Aldrich), em 50 mM acetato de sódio pH 5.0. Reações prosseguiram a 50 °C em termociclador MyCycler (Bio-Rad). Após 30 minutos, 1 M de

carbonato de sódio foi adicionado e a absorvância correspondente ao *p*NP liberado foi medida em 405 nm, em espectrofotômetro Synergy HTX (Biotek).

### 3.2.7 Purificação por aquecimento

A capacidade da *Ti*LPMO9H de resistir a variações de temperatura foi avaliada pela incubação de preparações enzimáticas nas temperaturas de 65, 75 e 85 °C, por 20 minutos, e resfriadas a 1 °C/min em termociclador MyCycler (Bio-Rad). Atividade residual de LPMO foi medida pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e atividade contaminante foi medida pela liberação de *p*NP, como descritos acima.

Após avaliação, a preparação enzimática foi diluída a 0,5 mg/ml em 50 mM tampão acetato de sódio pH 5.0, e incubada a 85 °C. Após 20 minutos, a solução foi retirada, e três vezes a concentração molar de CuSO<sub>4</sub> foi adicionada para ressaturação. A solução foi resfriada em temperatura ambiente por 30 minutos e depois centrifugada para remover proteínas precipitadas. O excesso de CuSO<sub>4</sub> foi removido por sucessivas trocas de tampão (50 mM acetato de sódio pH 5.0) em concentradores Spin-X UF (Corning) com corte de 10 kDa. *Ti*LPMO9H foi mantida a 4 °C.

### 3.2.8 Efeito do pH

O efeito do pH foi medido através da atividade de peroxidase da LPMO, como previamente descrito.<sup>110</sup> A mistura de reação consistiu em 1 mM 2,6-DMP (Sigma-Aldrich), 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e 100 mM de tampão (acetato de sódio pH 5.0, fosfato de sódio pH 6.0 e 7.0, fosfato de potássio pH 8.0, ou borato de sódio pH 9.0 e pH 10.0). A mistura foi incubada a 30 °C em espectrofotômetro. A reação foi iniciada com a adição de 1 µM *Ti*LPMO9H. Foram feitos controles sem enzima em cada um dos pHs. As reações prosseguiram a 30 °C. A formação de coeruligona foi acompanhada com medição de absorvância em 469 nm.

O efeito dos pHs 5.0 e 7.0 foram adicionalmente investigados com substrato celulósico e detecção de celo-oligossacarídeos oxidados. As reações continham 1 µM *Ti*LPMO9H, 50 g/L Avicel PH-101 (Sigma-Aldrich), 50 mM tampão McIlvaine pH 5.0 ou pH 7.0, e 1 mM ácido ascórbico ou ácido gálico (ambos Sigma-Aldrich). As reações foram em tubos de 2 ml com tampa rosqueável, em ThermoMixer C (Eppendorf) e ocorreram a 50 °C, 600 rpm. Alíquotas foram retiradas depois de 3, 5 e 24 horas, fervidas por 10 minutos, diluídas a metade com tampão e centrifugadas por três minutos. O sobrenadante foi filtrado



em placas MultiScreen de corte 0.22  $\mu\text{M}$  (Merck) e os celo-oligossacarídeos solúveis foram detectados por HPAEC-PAD.

### 3.2.9 Especificidade

Atividade em diferentes substratos foi medida pela produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como descrito acima, pois a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por LPMO é suprimida na presença de substrato. Na mistura de reação com Amplex Red (como descrito anteriormente), também foi adicionado 0.1% dos substratos PASC (preparado como descrito<sup>111</sup>), xiloglucano de semente de tamarindo, beta-glucano de cevada, glucomanano de konjac, liquenano de musgo islandês (todos Megazyme), xilano de faia ou carboximetil celulose (ambos Sigma-Aldrich). Uma reação sem adição de substrato foi usada como controle (100% de produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### 3.2.10 Ativação por luz

Catálise induzida por luz foi investigada em reações que continham 1  $\mu\text{M}$  *Ti*LPMO9H, 50 g/L Avicel PH-101, 50 mM tampão McIlvaine pH 5.0 ou pH 7.0, 0.8 mM clorofilina (Sigma-Aldrich) e 1 mM ácido ascórbico. As reações foram em tubos de 2 ml com tampa rosqueável, em ThermoMixer 5350 (Eppendorf), com agitação de 600 rpm, a 50 °C, sob luz branca. Após três horas as reações foram fervidas por cinco minutos, diluídas à metade com tampão, centrifugadas, e o sobrenadante foi filtrado em placas MultiScreen (Merck) com corte 0,22  $\mu\text{m}$ . Os produtos solubilizados foram analisados por HPAEC-PAD.

### 3.2.11 HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection)

Oligossacarídeos solúveis foram analisados em sistema com coluna de guarda Dionex CarboPac PA1 (2x50 mm, Thermo Scientific) conectada a coluna analítica Dionex CarboPac PA1 (2x250 mm, Thermo Scientific), controladas por Dionex ICS 5000+ (Thermo Scientific). Os eluentes foram: 0.1 M NaOH (A), e solução 0.1 M NaOH com 1 M acetato de sódio (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 0 a 10% B em 10 minutos, 10-30% B em 15 minutos, 30-100% B em 5 minutos, 100% B por 8 minutos, 100-0% B em um minuto. A coluna foi reequilibrada por 15 minutos. Foram usados como padrão celo-oligossacarídeos nativos (Megazyme), e celo-oligossacarídeos oxidados em C1 foram produzidos como descrito.<sup>112</sup>

### 3.2.12 Análise de espalhamento de raios-X a baixo ângulo e modelo estrutural de baixa resolução

Os dados foram coletados e analisados pelo Dr. Evandro Ares de Araújo, de acordo com os métodos descritos a seguir.

Os dados foram obtidos na linha de luz D01B do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (CNPEM). Os dados foram coletados utilizando detector PILATUS 300K (Dectris), à distância de 0,88 m da amostra e 8 keV de energia de raio-X; o intervalo de transferência de momento coberto foi de  $0,01 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,50 \text{ \AA}^{-1}$ . As amostras de proteína utilizadas foram nas concentrações de 1 e 3 mg/ml, com exposição de 30 segundos e 1 segundo de taxa de *frame*.

Os dados foram tratados usando o programa FIT2D<sup>113</sup> e os brancos só de tampão foram subtraídos usando um *script in-line*. Os parâmetros de espalhamento de intensidade  $I(0)$  e de raio de giro foram obtidos utilizando a aproximação de Guinier com o programa PRIMUS.<sup>114</sup> A função de distribuição e dimensão máxima das moléculas ( $D_{\max}$ ) foram calculadas com o programa GNOM.<sup>115</sup>

Dezoito envelopes moleculares *ab initio* foram reconstruídos utilizando GASBOR,<sup>116</sup> a média foi calculada por DAMAVER<sup>117</sup> e o programa AMBIMETER<sup>118</sup> foi usado para estimar sua singularidade. O modelo estrutural de alta resolução foi sobreposto ao modelo *ab initio* refinado utilizando o programa SUPCOMB.<sup>116</sup> Análise de corpo rígido multidomínio e reconstrução da região de linker foi feita com CORAL.<sup>119</sup> Resolução do conjunto de modelos *ab initio* foi calculada por SASRES.<sup>120</sup> O peso molecular da proteína em solução foi estimado utilizando o servidor SAXSMoW 2.0.<sup>121</sup> Análises de flexibilidade foram feitas com o programa EOM<sup>122</sup> usando parâmetros padrão para partículas nativas, e pelo gráfico de Kratky.<sup>123</sup>

As estruturas experimentalmente determinadas do domínio catalítico de HjlPMO9A de *H. jecorina* (5O2W no PDB<sup>41</sup> e o CBM1 de *T. reesei* - 1CBH no PDB<sup>124</sup>) foram usados como modelos para a construção do modelo estrutural com MODELLER.<sup>125</sup> Para estimar as intensidades de espalhamento a partir das coordenadas atômicas do modelo foi usado o servidor FoXS.<sup>126</sup> A estrutura 3D construída foi visualizada com o programa PyMOL.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene para a LPMO *TtLPMO9H*, de *T. thermophilus* foi clonado e transformado em *A. nidulans* pelo grupo coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Segato (USP – Lorena).

A sequência de aminoácidos indica que a enzima pertence à família AA9 do CAZy, possui peptídeo sinal para secreção e dois domínios, sendo um deles o domínio catalítico de classificação Pfam Glycoside hydrolase 61 (resíduos 21-235) e o outro o domínio de ligação a carboidratos CBM1 (resíduos 309-342). Os dois domínios são conectados por um *linker* longo (74 aminoácidos) e rico em resíduos de serina e treonina. A sequência de aminoácidos *TtLPMO9H* não possui alta similaridade com outras LPMOs do mesmo organismo. A sequência possui 79.9% identidade com *PaLPMO9A* de *P. anserina*, de régio-especificidade C1/C4.<sup>59</sup> Quando comparada a LPMOs com estruturas determinadas, *TtLPMO9H* tem 59.44% de identidade com *HjLPMO9A* de *H. jecorina*<sup>41</sup> e 53.95% com *TaLPMO9A* de *T. aurantiacus*, ambas também de atividade em C1/C4. *TtLPMO9H* foi agrupada próxima a outras LPMOs de atividade C1/C4 (Apêndice B, Figura 42).

*TtLPMO9H* recombinante foi produzida e secretada pelo fungo *A. nidulans*, e purificada por precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografias de interação hidrofóbica e de exclusão molecular. A eluição enzimática foi acompanhada através de medição de absorbância em 280 nm e a pureza da preparação foi avaliada por SDS-PAGE (Figura 6).

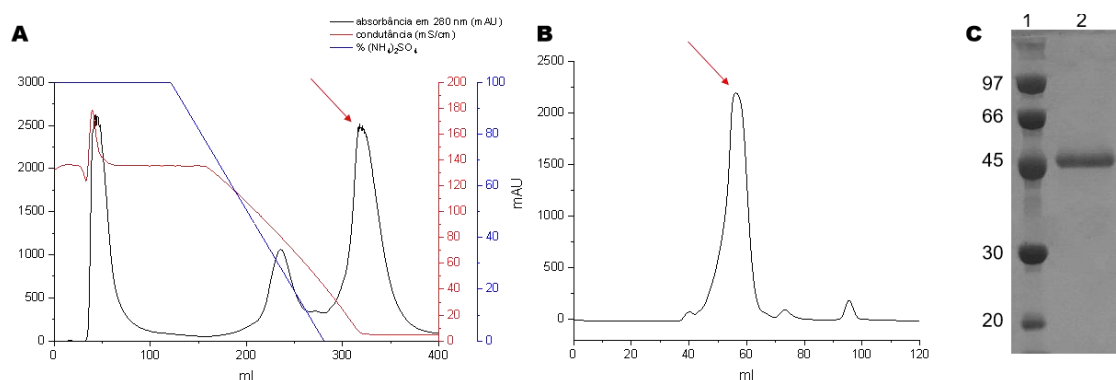


Figura 6 - Curvas das cromatografias de purificação e gel de eletroforese SDS-PAGE de *TtLPMO9H* purificada. Curva da cromatografia de interação hidrofóbica (A), curva da cromatografia de exclusão molecular (B) e análise da pureza de *TtLPMO9H* purificada. Em A e B, as setas em vermelho indicam o pico de eluição da enzima recombinante. Em C, 1 indica os padrões de massa molecular, cujos valores estão à esquerda (em kDa), e 2 indica *TtLPMO9H* concentrada após a cromatografia de exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 6, a proteína produzida aparece como uma banda de massa molecular de aproximadamente 47 kDa, superior a massa molecular teórica. Essa diferença é provavelmente causada por modificações pós-traducionais introduzidas pelo organismo hospedeiro, especificamente a adição de glicosilações.

A estabilidade térmica estrutural da TtLPMO9H em diversos tampões, em diferentes pHs, foi analisada por Thermofluor. Entre os pHs 4.5 e 7.0, as temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) foram as mais altas, entre 70 e 75 °C (Figura 7).

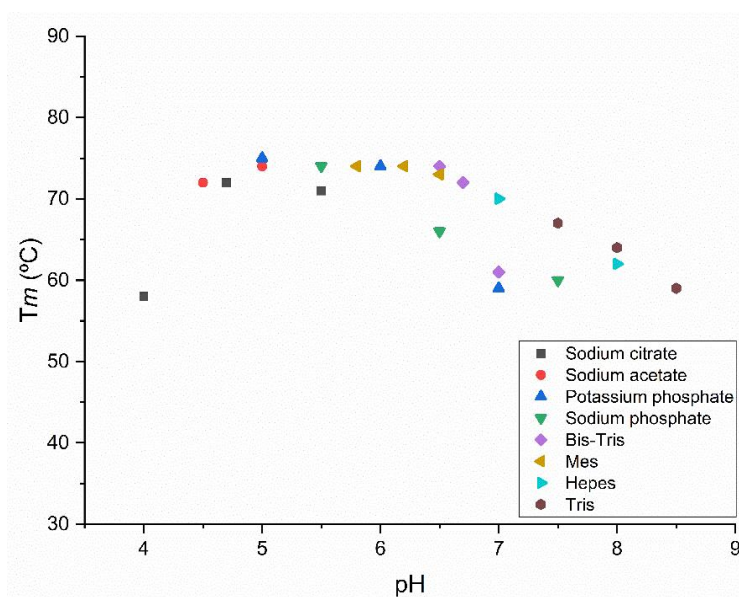


Figura 7 - Temperaturas de desdovramento de TtLPMO9H. Temperatura de *melting* de TtLPMO9H depende do tipo de tampão e pH da solução.

Fonte: Elaborada pela autora.

A produção de enzima recombinante em um organismo hospedeiro que produz seu próprio arsenal de celulasas pode resultar na presença de enzimas indesejadas na preparação final. Esse foi o caso, no qual mesmo após as etapas de purificação, e apesar de aparentar pureza, foi detectada atividade celulolítica. *p*NPG, (substrato sintético de  $\beta$ -glicosidases) e *p*NPC (substrato de CBHs e EGs) foram usados para avaliar a pureza da preparação, por não serem substratos de LPMOs. Foi detectada atividade com *p*NPG. A presença de hidrolases interfere na análise de resultados das reações com LPMOs, o que torna mais complexa a interpretação de reações que já sofrem de múltiplas vias alternativas.<sup>61, 127</sup> *A. nidulans* é um fungo mesofílico, enquanto *T. thermophilus*, como o nome indica, é um organismo termofílico. Além disso enzimas termoestáveis produzidas de forma recombinante tendem a manter suas termoestabilidades.<sup>128</sup> Para diminuir este *background* de hidrolases sem acarretar perda de atividade de TtLPMO9H, e levando em consideração a temperatura de

*melting* da mesma, assim como resultados publicados,<sup>75, 129-131</sup> tratamento térmico foi avaliado como última etapa de purificação.

A preparação enzimática foi incubada por 20 minutos nas temperaturas de 65, 75 e 85 °C e resfriada em seguida (Figura 8a). A atividade residual foi medida através da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,<sup>62</sup> e foi detectada, apesar de ter sido observada pequena diminuição na quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido. Após saturar novamente a preparação com cobre, a atividade da LPMO foi restaurada (Figura 8b). Ao mesmo tempo, ocorreu a diminuição na atividade celulolítica de *background* (Figura 8c).

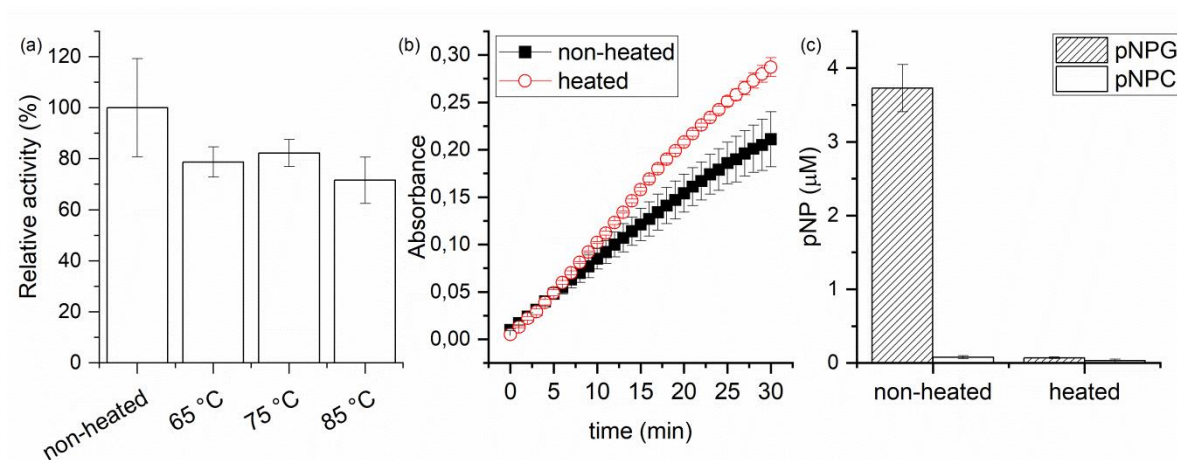


Figura 8 - Efeito de tratamento térmico na atividade de LPMO e de hidrolases. (a) Atividade residual após incubação; (b) Atividade residual após incubação e ressaturação de TtLPMO9H com cobre; (c) atividade residual celulolítica.

Fonte: Elaborada pela autora.

A atividade da TtLPMO9H em diferentes pHs foi analisada usando o método com o reagente 2,6-DMP, que mede a atividade de peroxidase das LPMOs. Como pode ser observado na Figura 9a, em pHs alcalinos, a enzima reage rapidamente, mas após dez minutos a absorbância, que corresponde à formação de produtos, não aumenta mais. Enquanto isso, em pHs 6.0 e 7.0, após 30 minutos a absorbância continuava crescendo. Quase nenhuma atividade foi observada em pH 5.0, comumente utilizado para a atividade enzimática de celulases. Comportamento similar neste pH foi publicado,<sup>132</sup> onde atividade em pH 5.0 foi menos que 20% da atividade no pH ótimo.

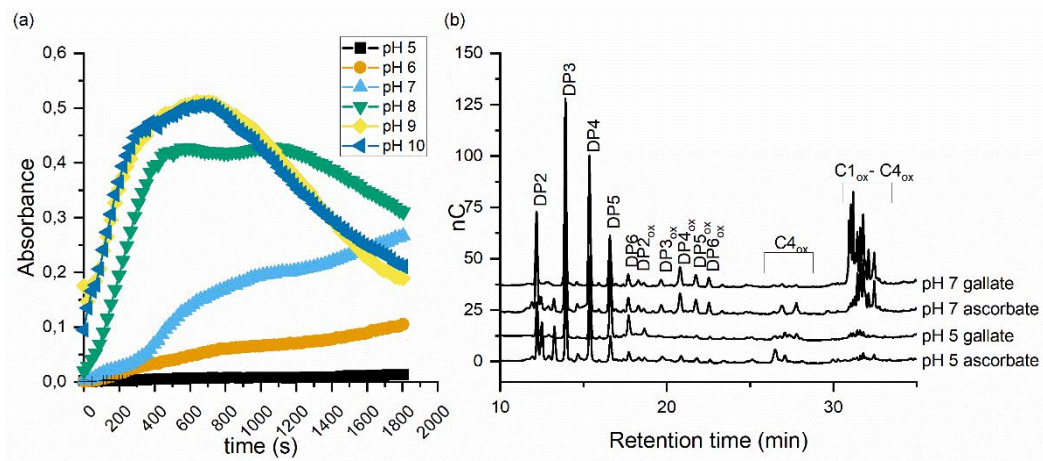


Figura 9 - Efeito de pH na atividade de TtLPMO9. (a) Atividade peroxidase da TtLPMO9H, medida com 2,6-DMP. Em (b) perfil HPAEC-PAD de produtos solúveis liberados depois de 24 horas, quando Avicel foi utilizado como substrato, e com ácido ascórbico ou gálico como agentes redutores. As marcações indicam os celo-oligossacarídeos detectados, sendo DP o grau de polimerização. DP<sub>n</sub><sub>ox</sub> para produtos oxidados no carbono C1; C4<sub>ox</sub> para produtos oxidados no carbono C4; C1<sub>ox</sub>-C4<sub>ox</sub> para produtos com as duas extremidades oxidadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

O pH também influenciou a formação de produtos oxidados utilizando Avicel como substrato. A enzima foi incubada em tampões de pH 5.0 e de pH 7.0, com ácido ascórbico ou ácido gálico como doadores de elétrons. Amostras foram retiradas em 3 h, 5 h ou 24 h para acompanhar o acúmulo de produtos solúveis liberados, que foram separados e analisados por HPAEC-PAD, Figura 9b.

Como pode ser observado na Figura 9b, nos dois pHs e com qualquer dos dois doadores de elétrons, foram detectados celo-oligossacarídeos não oxidados, que eluem primeiro, seguidos por oligossacarídeos oxidados no carbono C1, por oligossacarídeos oxidados no carbono C4, e finalmente por celo-oligossacarídeos oxidados nas duas extremidades, C1 e C4.<sup>44</sup> Os produtos solúveis foram confirmados por espectrometria de massa, através da qual foram detectados produtos de grau de polimerização de até nove resíduos de glicose, com e sem as modificações introduzidas pela LPMO (Apêndice B, Figuras 43 e 44).

Como pode ser observado na Figura 10, de maneira geral, pH 7.0 resultou em maior liberação de produtos solúveis que pH 5.0 (medido em soma total nC\*min). Apesar do ensaio anterior de painel de pHs apontar para baixa atividade em pH 5.0, produtos foram detectados na fração solúvel, indicando que a enzima é, de fato, ativa nesta condição. Além disso, em pH 5.0, ácidos ascórbico e gálico resultam em aparente diferença quanto a produtos oxidados em C4. Infelizmente não foi possível quantificar esses produtos pela falta de padrões

disponíveis. Curiosamente, não foi observada diferença na quantidade de produtos oxidados em C1 no tempo, enquanto produtos não oxidados variaram, sendo que a condição pH 5.0 com ácido gálico foi a que resultou em maior aumento desse produto após 24 horas. Isto está de acordo com o resultado do Thermofluor, que mostrou maior estabilidade estrutural neste pH, e de estudo que sugere que ácido gálico proporciona reações mais lentas ou controladas, ou seja, com menor dano oxidativo para as LPMOs.<sup>70</sup> É interessante também observar que ocorreu acúmulo de produtos duplo-oxidados nos tempos, especialmente nas reações realizadas em pH 7.0.

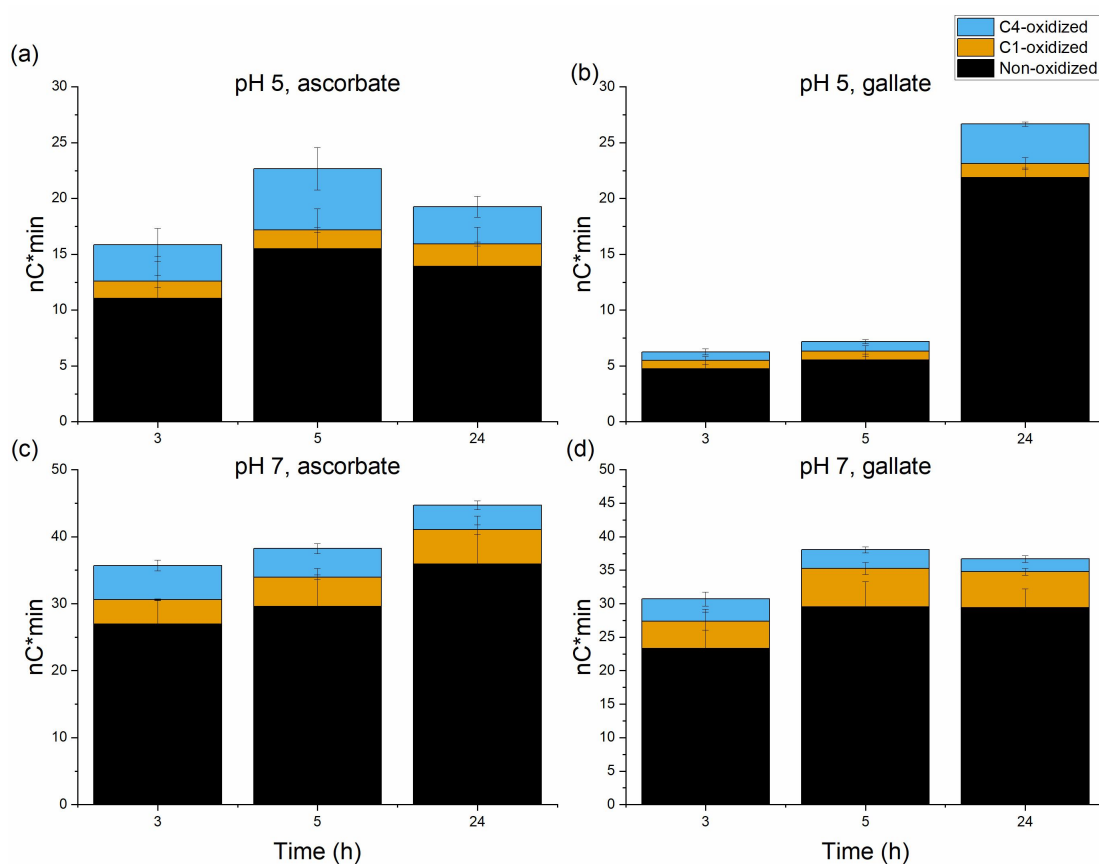


Figura 10 - Quantificação de produtos solúveis formados em reações em pH 5.0 ou pH 7.0, com ácido ascórbico ou gálico, em três tempos. Nos gráficos estão representadas a soma dos produtos (áreas nC\*min) de reações em (a) tampão pH 5.0 com ácido ascórbico; em (b) em pH 5.0 com ácido gálico; (c) em pH 7.0 com ácido ascórbico; em (d) em pH 7.0 com ácido gálico. Em preto, celo-oligossacarídeos não oxidados, em laranja celo-oligossacarídeos oxidados em C1, e em azul, oxidados em C4.

Fonte: Elaborada pela autora.

Catálise induzida por luz foi avaliada, utilizando os mesmos tampões nos pHs 5.0 e 7.0. Os perfis cromatográficos dos produtos estão na Figura 11.

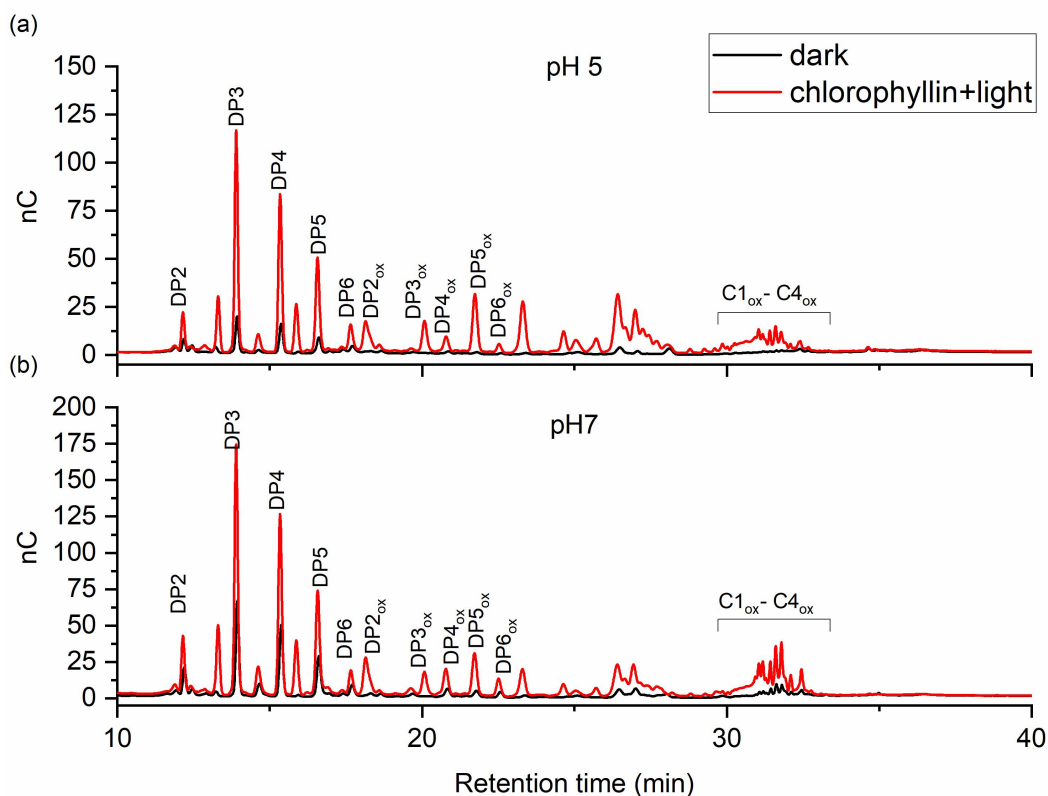


Figura 11 - Ativação de TtLPMO9H com clorofilina e luz. Comparação dos perfis de celo-oligosacarídeos solúveis liberados por TtLPMO9H em reações com adição de clorofilina e exposição à luz (vermelho) ou no escuro (preto). (a) reações em tampão pH 5.0 e em (b) em pH 7.0. Todas as reações tiveram a adição de ácido ascórbico. As reações foram em Avicel, por três horas, e os produtos solúveis foram detectados por HPAEC-PAD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em estudo publicado que introduziu reações desencadeadas por luz, e utilizando pigmentos vegetais como foto-sensibilizadores,<sup>89</sup> foi mostrado que esta condição resultava em aumento de 20x na quantidade de produtos solúveis formados. De fato, também foi observado aumento na quantidade de produtos quando *TtLPMO9H* foi exposta à luz por três horas de reação (Figura 12).



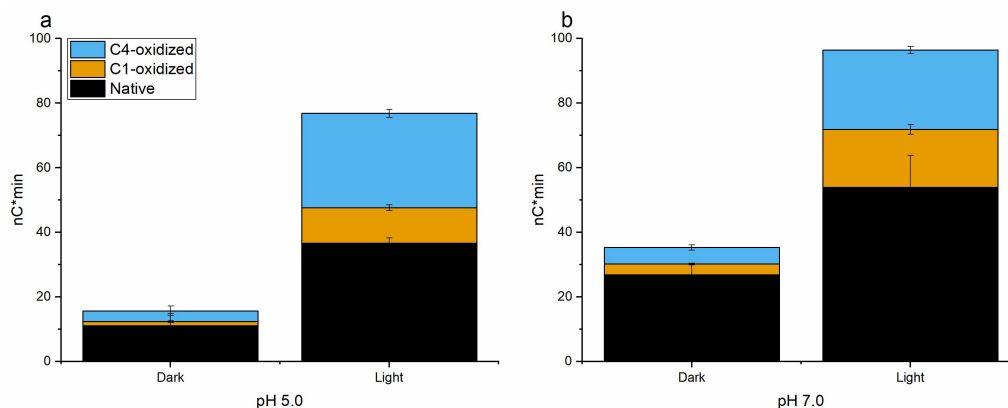


Figura 12 - Quantificação dos produtos liberados em reações com luz ou no escuro. As reações foram feitas em pH 5.0 (a) e pH 7.0 (b). A quantificação foi feita pelo cálculo de áreas (nC\*min) dos que correspondem a produtos não oxidados, e oxidados em C1 ou C4 nos cromatogramas de HPAEC-PAD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Novamente, pH 7.0 foi o que promoveu maior acúmulo de produtos solúveis, e tanto produtos oxidados quanto não-oxidados aumentaram em 2.7x, quando comparados a reação em mesma condição, mas realizada no escuro. No entanto, um aumento de quase 5x vezes foi observado para a reação em pH 5.0, e, portanto, o benefício foi maior nesta condição. Atividade de TtLPMO9H em outros substratos diferentes de Avicel foram avaliados, utilizando a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como medida: quanto menos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectado, maior atividade da LPMO com o substrato. A atividade relativa de TtLPMO9H pode ser observada na Figura 13.

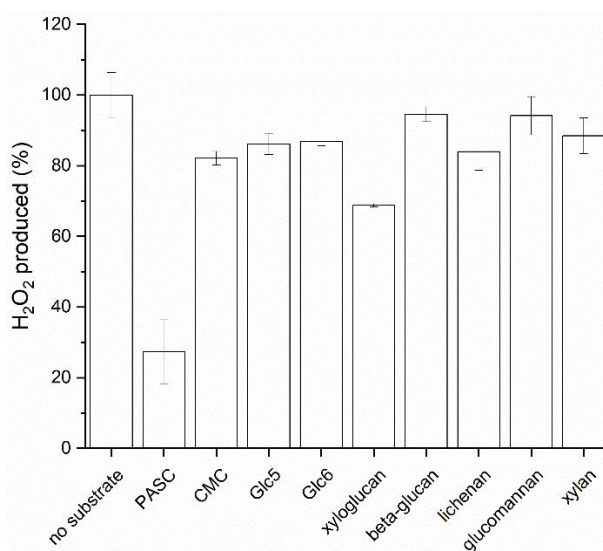


Figura 13 - Atividade de TtLPMO9H em diferentes substratos. A medida foi pela supressão de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por TtLPMO9H quando na presença de seu substrato. Glc5 e Glc6 são celopentaose e celohexaose, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre os substratos avaliados PASC (Avicel amorfizado com ácido fosfórico) foi o melhor, e pouca atividade foi observada em celulose amorfa com grupos carboximetilas (CMC) ou com os celo-oligosacarídeos celopentaose (Glc5) ou celohexaose (Glc6). O segundo melhor substrato foi xiloglucano (Figura 14), que assim como PASC, possui *backbone* de ligações  $\beta$ 1-4-D-glucopiranosídeo, mas ao contrário de PASC, possui “decorações”, que dificultam acesso da enzima. Substratos com outros tipos de ligações além de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosídeo não foram bons substratos para esta enzima.

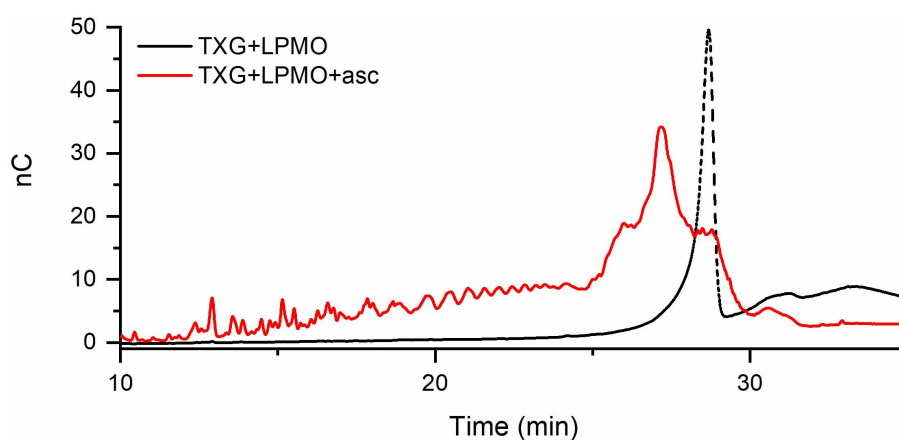


Figura 14 - Atividade de TtLPMO9H em xiloglucano. A atividade de TtLPMO9H em xiloglucano foi confirmada pelo perfil de produtos detectados por HPAEC-PAD. A curva mostra o perfil de reação de 24 horas, com 1  $\mu$ M LPMO, 0.2% xiloglucano em pH fosfato de sódio pH 7.0.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados obtidos pelas medidas de SAXS foram usados para estimar o raio de giro ( $R_g$ ) e a massa molecular, que foram, de  $25.0 \pm 0.6$  Å e 34.4 kDa, respectivamente. O gráfico de Kratky indicou proteína flexível e multidomínio, confirmado pelo perfil da função pareada de distância ( $P(r)$ ), que sugeriu duas subunidades separadas. O perfil indicou também uma dimensão máxima ( $D_{max}$ ) de TtLPMO9H foi de 86 Å, e pico que sugeriu que as glicosilações, presentes principalmente na região de *linker*, contribuíram consideravelmente para o espalhamento (Apêndice B, Figura 45).

O envelope molecular construído teve formato de *tadpole*, observado em estruturas de dois domínios separados espacialmente por um *linker*. O modelo estrutural, construído por homologia a partir das estruturas de HJLPMO9A e CBM1 de *T. reesei*, teve boa sobreposição ao envelope molecular.

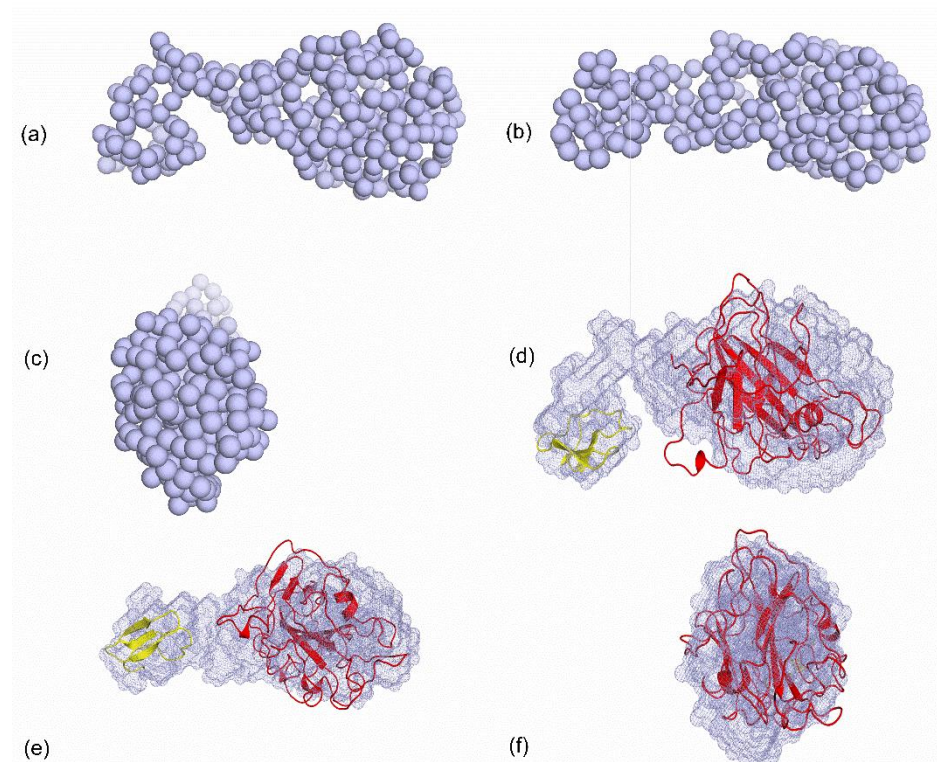


Figura 15 - Envelope *ab initio* de TtLPMO9H a partir de dados de SAXS. (a, b e c) Modelo *dummy residue* (cinza) construído *ab initio*, e rotacionado ao longo dos eixos y e x. (d, e e f) Sobreposição do modelo *ab initio* (cinza meio transparente) com o modelo estrutural de TtLPMO9H construído por homologia (em vermelho, domínio catalítico; em amarelo CBM1).

Fonte: ARAÚJO<sup>108</sup>

### 3.4 DISCUSSÃO

Uma das primeiras características que chamou a atenção para TtLPMO9H foi sua massa molecular bastante acima do valor teórico. Fungos filamentosos podem realizar várias modificações pós-traducionais, incluindo clivagem do peptídeo sinal, ligações dissulfeto e glicosiações,<sup>133</sup> além de metilação na histidina terminal em LPMOs.<sup>15</sup>

TtLPMO9H é bimodular, com domínios catalítico e CBM1. A presença do CBM1 mantém a LPMO por mais tempo em uma região do substrato, e a movimentação do domínio catalítico ao redor explicaria a solubilização de celo-oligossacarídeos curtos não modificados, assim como duplo-oxidados, pois há maior chance de a mesma cadeia ser clivada duas vezes.<sup>35</sup> O espalhamento de TtLPMO9H sugere que o *linker* que conecta os domínios é bastante estendido em solução, o que pode permitir a movimentação independente dos domínios. A região do *linker* contém alta glicosilação, o que mantém a separação entre os domínios. Regiões de *linker* são particularmente ricas em glicosilações do tipo *O*, que podem

influenciar na ligação ao substrato, como observado em celulasas,<sup>40</sup> além de estarem relacionadas a atividade e estabilidade das enzimas.<sup>89</sup>

LPMOs têm se mostrado enzimas bastante estáveis. De fato, reenovelamento da enzima já foi observado em *NcLPMO9C*<sup>75</sup> e *TaLPMO9A*.<sup>129</sup> Alguns fatores podem influenciar na estabilidade, como glicosilações (apesar de não serem necessárias à atividade ou reenovelamento de certas LPMOs<sup>129</sup>), redução e ligação a substrato.<sup>75</sup>

Tal comportamento de alta estabilidade pode ser usado, como foi aqui, para purificar enzimas. Temperatura, tempo de incubação e resfriamento podem ser adaptados para conseguir um balanço entre perda de LPMO e atividade, já que nem todas as LPMOs possuem tamanha estabilidade. Duas outras LPMOs de *T. thermophilus*, *MtLPMO9B* e *MtLPMO9D* foram desenoveladas de maneira irreversível em temperaturas acima de 70 °C.<sup>72</sup>

Quanto à atividade enzimática, *TtLPMO9H* teve régio-especificidade para os carbonos C1 e C4, e os perfis de produtos indicavam acúmulo de celo-oligossacarídeos não oxidados. No entanto, é importante ressaltar que produtos oxidados em C4 são bastante instáveis, e no pH básico dos eluentes de HPAEC, podem sofrer degradação durante a corrida, contribuindo para a quantidade de celo-oligossacarídeos nativos detectados.<sup>135</sup> Além disso, o aumento do pH torna mais fácil a doação de elétrons pelos agentes redutores,<sup>72</sup> o que contribui para maior atividade da LPMO em pHs mais básicos. Outro fator que pode influenciar a atividade da LPMO é o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente na reação, formado tanto pela LPMO que foi reduzida, mas não se ligou ao substrato,<sup>62</sup> quanto por reações entre o agente redutor e íons cobre livres em solução. Ácido ascórbico é especialmente reativo<sup>136</sup> e resulta em quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que são suficientes tanto para a atividade da LPMO quanto para sua inativação.

A LPMO recombinante caracterizada apresentou também atividade em hemiceluloses. Similaridades entre cromatogramas de *NcLPMO9M* com xiloglucano sugerem que *TtLPMO9H*, assim com 9M, pode ter modo de ação tolerante a substituições no esqueleto de xiloglucano,<sup>137</sup> o que a torna interessante para potencial aplicação na conversão de biomassa a açúcares fermentáveis.

*TtLPMO9H* foi ativada em sistema de foto-ativação, com diferenças em reações em pHs 5.0 e 7.0. Pode-se cogitar que essa diferença se deve ao dano oxidativo que a LPMO provavelmente sofre em pH 7.0 (quanto maior a atividade, mais rápido é o dano). As condições que podem afetar como uma LPMO reage à ativação por luz são diversas e incluem: a própria enzima, sua resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido, quantidade de ácido ascórbico, tempo de

incubação, intensidade e ciclo de luz.<sup>90, 91, 138</sup> As condições podem ser otimizadas de acordo com a aplicação pretendida, de forma a minimizar os danos à LPMO por espécies reativas de oxigênio.<sup>138</sup> Como descrito na introdução, existe debate a respeito do real agente redutor nas reações foto-ativadas (clorofilina ativada versus  $O_2^{\cdot-}$ ). Apesar das condições experimentais usadas não permitirem inferir a respeito da ativação da LPMO, ela aconteceu e gerou mais produtos do que reações que aconteceram no escuro.

Em conclusão, foi caracterizada uma LPMO pertencente à família AA9 que tem ampla estabilidade térmica e é ativa de pHs ácidos a básicos. Essas características, associadas à atividade em celulose e hemicelulose a tornam de interesse para potenciais aplicações.

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados.



## 4 LPMOS E OXIDOREDUTASES

---

### 4.1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios dos estudos de LPMOs, a enzima auxiliar celobiose desidrogenase foi apontada como enzima redutora de LPMOs. Alguns pesquisadores até mesmo especularam que a redução de LPMOs era a tão buscada função natural das CDHs.<sup>16</sup> Apesar de amplamente presentes em fungos, as bactérias, por outro lado, não produzem CDHs, levantando a pergunta, ainda não respondida, de qual seria a enzima parceira das LPMOs nesse caso.

Além disso, publicações dos últimos anos mostraram que outras enzimas auxiliares, incluindo de famílias distintas da AA3, também são capazes de atuar em conjunto com LPMOs.<sup>70, 71, 82, 83, 87</sup> Isso se tornou ainda mais relevante após descoberta da ação peroxigenásica das LPMOs,<sup>36</sup> pois muitas das enzimas auxiliares produzidas pelos organismos, concomitante à produção de LPMOs, são oxidases.<sup>70</sup>

Levando em consideração esses fatos, foi analisada a atividade de *Tt*LPMO9H em conjunto com uma aril-álcool oxidase, *Mt*AAOx, na produção e liberação de produtos oxidados de celulose. Além de *Mt*AAOx, outras duas AAs, *Mt*CDH e *Mt*GLOX foram avaliadas para a ativação de LPMOs.

### 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.2.1 Produção das enzimas

*Tt*LPMO9H foi produzida e purificada como descrito em Materiais e Métodos do capítulo anterior. *Mt*LPMO9A foi produzida e purificada como previamente publicado.<sup>139</sup> *Mt*AAOx<sup>140</sup> e *Mt*GLOX<sup>141</sup> foram previamente caracterizadas, e produzidas como descrito nas publicações. *Mt*CDH foi clonada e transformada em *Pichia pastoris* pelo Dr. Rafael Pedesi, e produzida, purificada e gentilmente cedida pelo mestrando Lorgio V. B. Samaniego. As concentrações das enzimas recombinantes foram calculadas utilizando os valores teóricos de massa molecular e coeficiente de extinção, obtidos da análise das sequências (maduras) de aminoácidos coma ferramenta ProtParam. Para *Mt*LPMO9A MW 22755 Da e  $\epsilon_{280}$  44140 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; *Mt*GLOX tem MW 101933 Da e  $\epsilon_{280}$  168550 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; *Mt*CDH tem MW 86338 Da e

$\epsilon_{280}$  157510 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A concentração de MtAAOx foi medida através da absorvância do cofator FAD ( $\epsilon_{450}$  = 11300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) liberado após a enzima ter sido fervida por 15 minutos.

#### 4.2.2 Ativação por MtAAOx

O sistema foi inicialmente avaliado utilizando quantidades equimolares de TtLPMO9H/MtLPMO9A e MtAAOx (2 µM), 0.2% PASC<sup>111</sup>, em 50 mM fosfato de sódio pH 7.0. As reações foram iniciadas com a adição de 5 mM álcool veratrílico (3,4-dimetóxi-benzil álcool, Sigma), substrato de MtAAOx. Reações ativadas por 1 mM ácido ascórbico foram feitas como controle. Todas as reações prosseguiram a 50 °C, com agitação de 1000 rpm em ThermomixerC (Eppendorf), por 24 horas. Todas as outras reações utilizaram essas condições, exceto quando explicitado.

Efeitos da variação da concentração de MtAAOx foi avaliado utilizando as condições acima descritas de pH, substrato, TtLPMO9H e álcool veratrílico, MtAAOx foi variada de 0-3 µM, e 5 mM álcool veratrílico foi adicionado para iniciar a reação. Já para avaliação do álcool veratrílico, este foi variado de 0-10 µM, com 3 µM MtAAOx; os outros componentes foram adicionados nas mesmas concentrações usadas no teste inicial. O sistema de doação MtAAOx/álcool veratrílico foi comparado com doação de elétrons por ácido ascórbico, substituindo o sistema enzimático por 0-10 mM ácido ascórbico. A atividade de MtAAOx foi medida por absorvância do produto, veratraldeído (3,4-dimetóxi-benzaldeído), utilizando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{310\text{nm}} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .<sup>142</sup> Para as curvas de progressão de produtos no tempo, foram retiradas alíquotas em 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 24 horas.

Para todas as reações, os celo-oligossacarídeos solubilizados foram detectados e identificados por HPAEC-PAD.

#### 4.2.3 Papel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ativação de TtLPMO9H

O papel do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela atividade de MtAAOx foi inicialmente avaliado pelo efeito da adição de catalase (de fígado bovino, Sigma). Seguindo as mesmas condições de reação anteriormente usadas, catalase foi adicionada em concentrações variando de 0-5 µM.



A ativação de TtLPMO9H com álcool veratrílico ou anisílico, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> externo também foi avaliada, pela adição de 0-500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a reações sem MtAAOx. Os produtos foram detectados por HPAEC-PAD.

#### 4.2.4 Atividade de oxidase de TtLPMO9H

2 µM TtLPMO9H em 50 mM fosfato de sódio pH 7.0 em microplaca UV-transparente (Greiner) foi incubado em espectrofotômetro M200 Pro (TECAN), a 30 °C. Após 2 minutos, as reações foram iniciadas com adição de 10 mM álcool veratrílico ou 5 mM álcool anisílico, e as absorbâncias foram monitoradas em 310 nm ou 285 nm, respectivamente. As concentrações dos respectivos aldeídos foram calculadas usando os coeficientes de extinção  $\epsilon_{310\text{nm}} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $\epsilon_{285\text{nm}} = 16950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.5 Transferência direta de elétrons entre MtAAOx e TtLPMO9H

MtAAOx a 15 µM foi reduzida com 10 mM de álcool veratrílico ou álcool anisílico, e 30 µM TtLPMO9H foi adicionado à MtAAOx reduzida. O estado do co-fator FAD, de MtAAOx, foi monitorado em 450 nm, ao longo do tempo, para observar se a re-oxidação foi acelerada pela adição de LPMO.

#### 4.2.6 Ativação por MtGLOX e MtCDH

Ativação de TtLPMO9H e MtLPMO9A foi avaliada com duas outras enzimas auxiliares, MtCDH e MtGLOX. As reações continham: 2 µM de LPMO (9H ou 9A), com 0.2% PASC, 50 mM fosfato de sódio pH 6.0, 0.1 µM MtGLOX ou 0.5 µM MtCDH. As reações foram iniciadas com adição de 5 mM de metilglioxal/hidroximetilfurural (substratos de MtGLOX, Sigma) ou 5 mM de celobiose/lactose (substratos de MtCDH, Sigma). Às reações controle foram adicionados os substratos das oxidases e 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no lugar das oxidases. Todas as reações foram por 24 horas a 50 °C e agitação de 1000 rpm em ThermomixerC. Os produtos foram avaliados por HPAEC-PAD.

#### 4.2.7 Detecção de celo-oligossacarídeos por HPAEC-PAD

Ao fim dos tempos de reação, todas as amostras foram fervidas por 15 minutos para desnaturar as enzimas e parar reações. Depois foram centrifugadas para separar o substrato insolúvel, e a parte solúvel foi filtrada em filtros de seringa de corte 0.22 µm. Os produtos solubilizados pela atividade das LPMOs foram detectados por HPAEC-PAD, usando

coluna analítica CarboPac PA1 2x250 mm com coluna-guarda CarboPac PA1 2x50 mm (ambas Thermo Scientific) em sistema Dionex ICS-5000 (Dionex) controlado por Chromeleon 7 (Thermo Scientific). Os eluentes foram 0.1 M NaOH e 0.1 M NaOH com 1 M acetato de sódio. O gradiente de eluição foi o mesmo do capítulo anterior. Celo-oligossacarídeos não oxidados (DP 2-6) foram identificados utilizando padrões comerciais (Megazyme); oxidados no carbono C1 foram identificados utilizando padrões quimicamente oxidados, como descrito anteriormente.<sup>112</sup>

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Ativação de LPMOs por *MtAAOx* e álcool veratrílico

Produtos de ação de TtLPMO9H foram detectados quando *MtAAOx* e seu substrato, álcool veratrílico foram adicionados à reação com PASC. Como pode ser observado na Figura 16, os tipos de produtos detectados foram os mesmos (oxidações nos carbonos C1 e C4) e formaram perfil similar ao da reação que utilizou ácido ascórbico como agente redutor. O efeito também foi observado com a enzima *MtLPMO9A*, da mesma família e organismo, mas cuja ação produz somente oxidações do tipo C1.

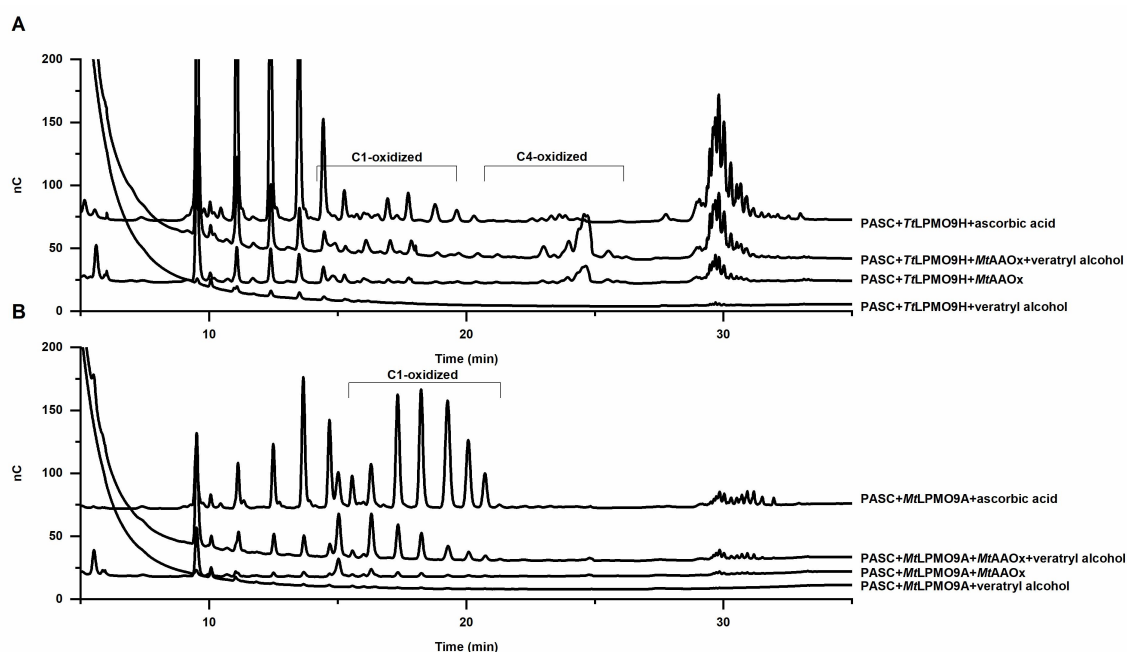


Figura 16 - Ativação de LPMOs com *MtAAOx*. Cromatogramas HPAEC-PAD de produtos solúveis de reações alimentadas por *MtAAOx*+álcool veratrílico. Em A produtos de TtLPMO9H e B de *MtLPMO9A*. Os cromatogramas mostram os produtos liberados após reações de 24 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em experimentos subsequentes, os produtos de TtLPMO9H variaram de acordo com variações nas concentrações de MtAAOx, e nas de álcool veratrílico, como pode ser observado nas Figuras 17 e 18, respectivamente. Vale pontuar que pela dificuldade de quantificação de produtos da LPMO, pela ausência de padrões, a atividade foi medida pela integração das áreas dos picos dos produtos detectados por HPAEC-PAD, e expressa em nC\*min.

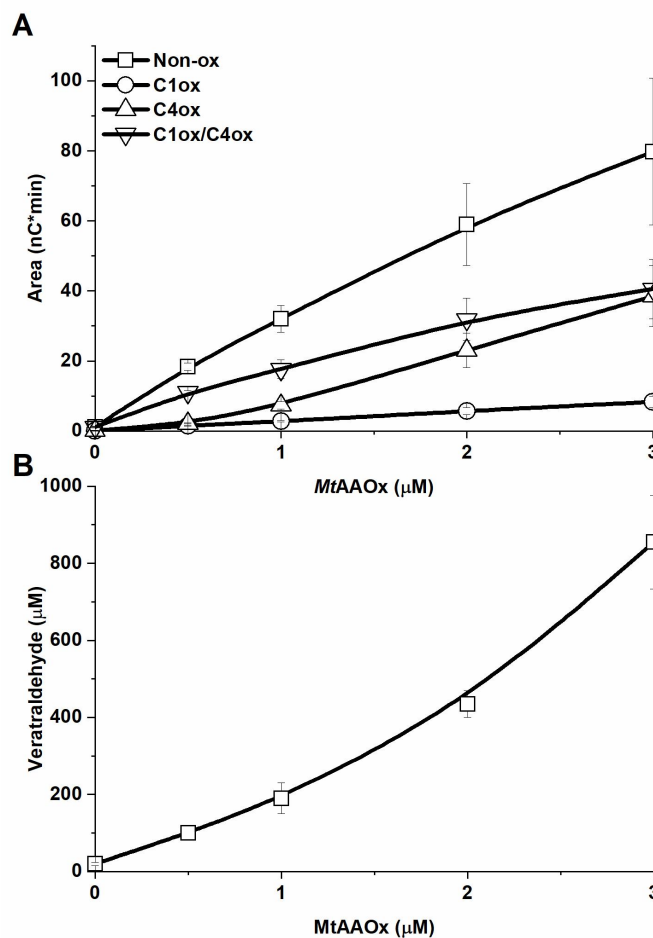


Figura 17 - Efeito da variação na concentração de MtAAOx. Produtos da atividade de TtLPMO9H (A). Em B, produtos de oxidação de álcool veratrílico, veratraldeído. As reações foram com substrato PASC, por 24 horas a 50 °C. A atividade da LPMO foi calculada como a soma das áreas dos picos correspondentes a celo-oligossacarídeos não oxidados (non-ox), oxidados em C1 (C1ox), em C4 (C4ox) e em ambas as extremidades (C1ox/C4ox). Veratraldeído foi quantificado por método espectrofotométrico.

Fonte: Elaborada pela autora.

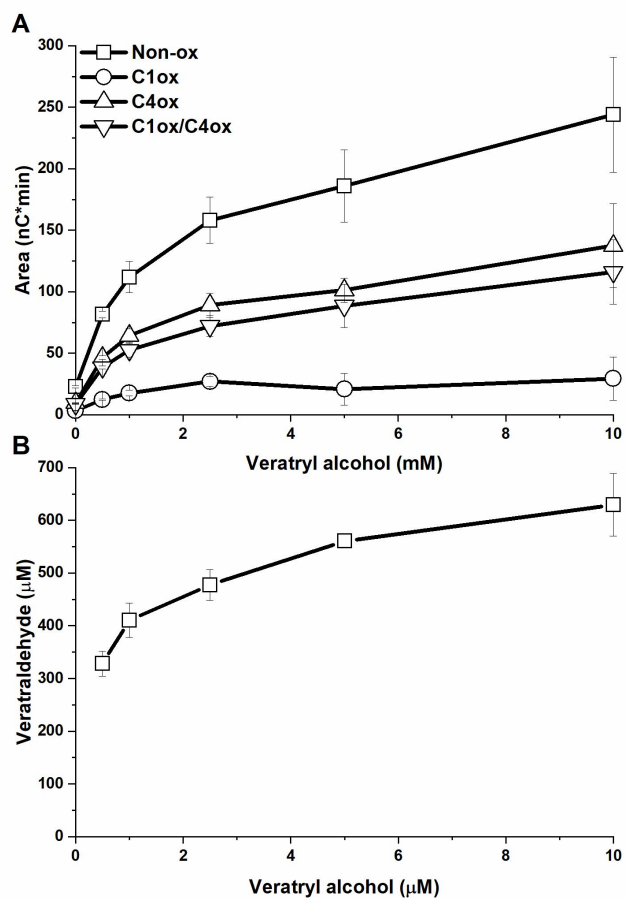


Figura 18 - Efeito da variação de álcool veratrílico na atividade de TtLPMO9H. Em B, atividade de MtAAOx.

Fonte: Elaborada pela autora.

Também foi avaliada a progressão das reações de TtLPMO9H iniciadas por MtAAOx+álcool veratrílico ao longo do tempo, em comparação com as reações iniciadas por ácido ascórbico (Figura 19). Já nas primeiras horas grandes diferenças foram observadas. A adição de ácido ascórbico resultou em rápido acúmulo de produtos (Figura 19C), enquanto o sistema enzimático resultou em resposta mais lenta (Figura 19B). No entanto, como podemos observar, após 24 horas o acúmulo total de produtos foi equiparável entre os dois sistemas (Figura 19D).

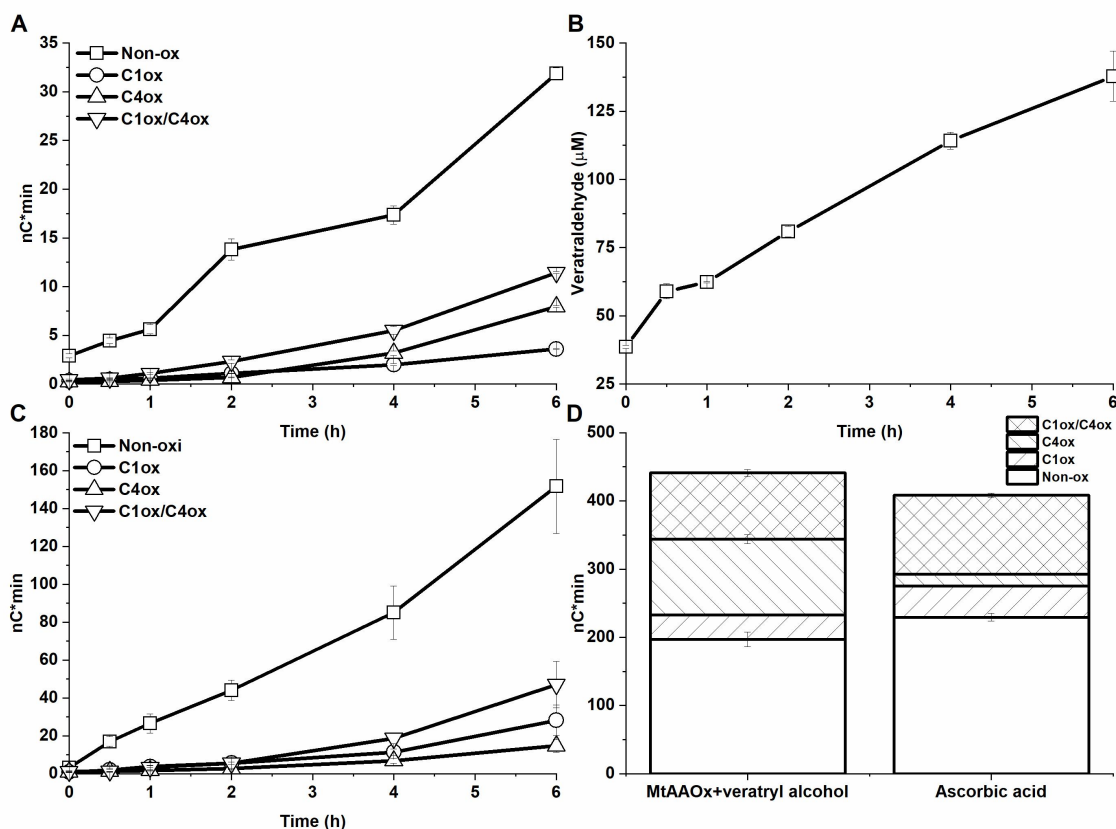


Figura 19 - Produtos da ativação por MtAAOx e ácido ascórbico ao longo do tempo. A e B mostram os produtos da ativação enzimática, sendo A os produtos de TtLPMO9H e B, os produtos de MtAAOx, ao longo das primeiras seis horas. Em C, produtos de TtLPMO9H com ativação por ácido ascórbico no mesmo intervalo de tempo. Em D, comparação dos produtos de LPMO com os dois tipos de ativação, após 24 horas de reação.

Fonte: Elaborada pela autora.

O que chama atenção na Figura 19D é a proporção de produtos com oxidação no carbono C4, muito mais presente nas reações com MtAAOx do que nas reações com ácido ascórbico.

Com o intuito de investigar o papel do  $H_2O_2$  produzido por MtAAOx na atividade de TtLPMO9H, foi adicionada à reação a enzima catalase, em concentração variável. Catalase é uma peroxidase que converte  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ , e dessa maneira diminui a disponibilidade de  $H_2O_2$  para a reação peroxigenásica da LPMO.

Como pode ser observado na Figura 20, em baixas concentrações, a adição de catalase resultou em aumento da atividade de TtLPMO9H. Concentrações de catalase superiores à de LPMO levaram a redução de produtos totais. No entanto, as condições testadas não foram suficientes para extinguir a detecção de produtos.

Efeito da adição de catalase as reações de TtLPMO9H e MtAAOx.

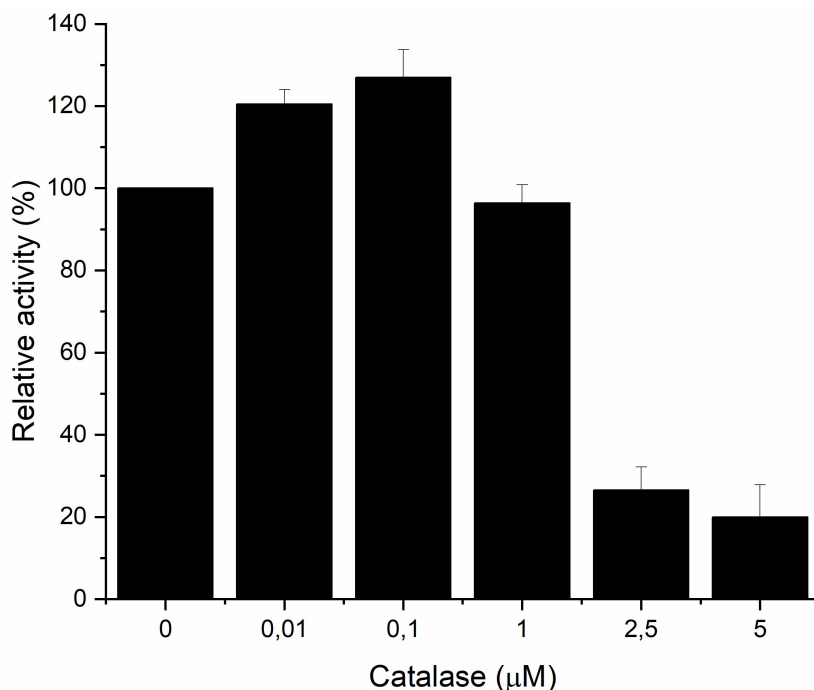


Figura 20 - Efeito da adição de catalase as reações de TtLPMO9H e MtAAOx. Catalase em diferentes concentrações foi adicionada às reações de TtLPMO9H com MtAAOx e álcool veratrílico para consumir o  $H_2O_2$  liberado pela atividade da oxidase, em reações de 24 horas. A área total de produtos foi calculada, e o efeito da catalase foi exposto na forma de atividade relativa.

Fonte: Elaborada pela autora.

A desnaturação prévia de MtAAOx (antes de TtLPMO9H ser adicionada, mas após reação com álcool veratrílico), resultou na extinção dos picos relativos aos produtos oxidados, como pode ser observado na Figura 21. Esse resultado indica que de alguma forma a reação de TtLPMO9H depende de MtAAOx para gerar produtos. No entanto, não foi possível saber se a dependência é de redução direta entre as enzimas ou de  $H_2O_2$ .

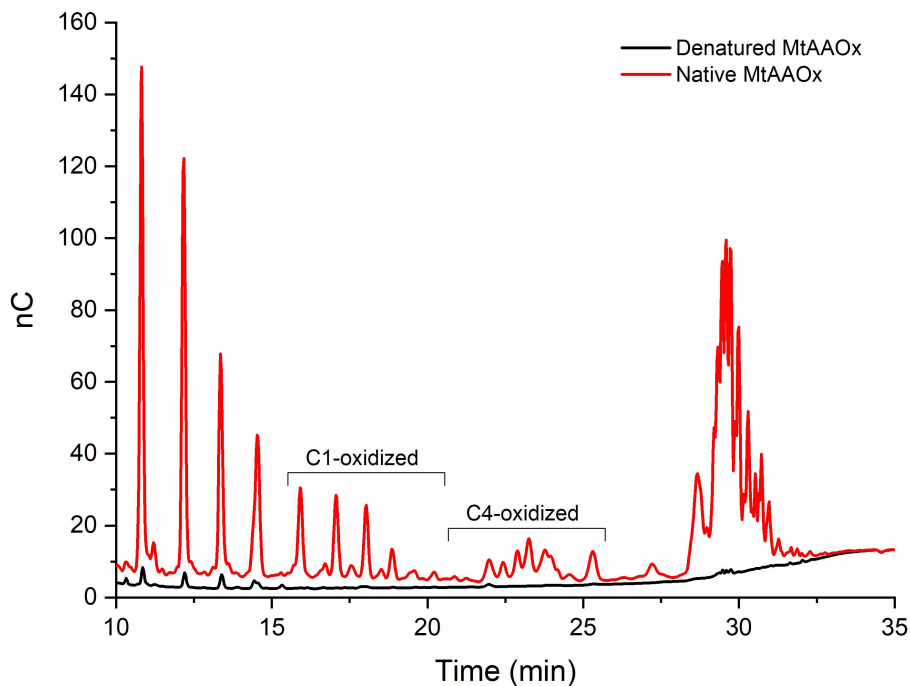


Figura 21 - Efeito da desnaturação de MtAAOx. Em vermelho, produtos de reação com MtAAOx, e em preto produtos de reação na qual foi usada MtAAOx desnaturada, e posteriormente adicionada nas reações, que prosseguiram por 24 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para investigar se TtLPMO9H era dependente do  $H_2O_2$ , ao invés de adicionar MtAAOx como produtora *in situ*, o  $H_2O_2$  foi externamente adicionado à reação. Como pode ser observado na Figura 22, na presença de álcool veratrílico ou anisílico, e  $H_2O_2$ , TtLPMO9H liberou celo-oligossacarídeos a partir de PASC. Estes resultados sugerem que o  $H_2O_2$  produzido por MtAAOx foi fundamental às reações nas quais foi usada para alimentar TtLPMO9H.

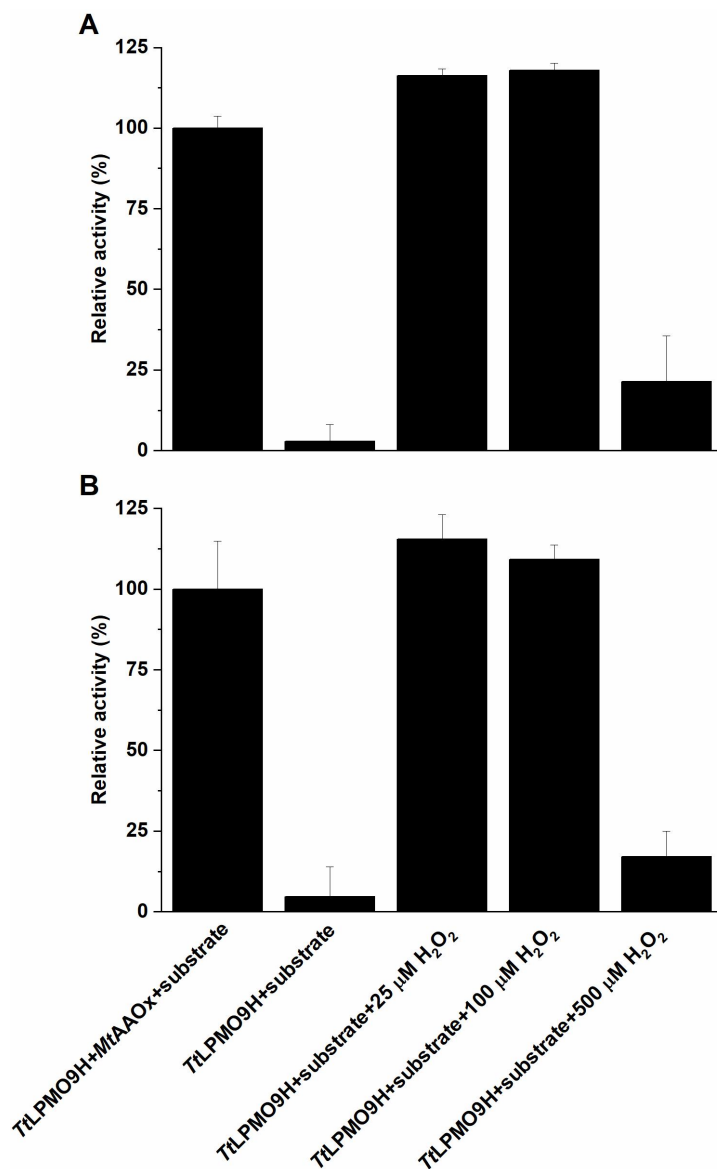


Figura 22 - Efeito da adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$    reação de TtLPMO9H e álcool veratrílico. (A) e álcool anisílico (B). Os álcoois estão referidos na figura como “substrates”. A figura mostra os resultados de reações de 24 horas. A atividade relativa foi calculada a partir da área total nos cromatogramas HPAEC-PAD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, foi feita uma tentativa de verificar se a transferência direta entre enzimas também contribuía para as reações TtLPMO9H+MtAAOx+ lcool aromático. Após ter seu cofator FAD reduzido pela adição de seu substrato, pode-se observar que a adição de TtLPMO9H em excesso não ajudou na re-oxidação de MtAAOx (Figura 23). Portanto, não há evidência de que ocorre transferência de elétrons entre as enzimas TtLPMO9H e MtAAOx.



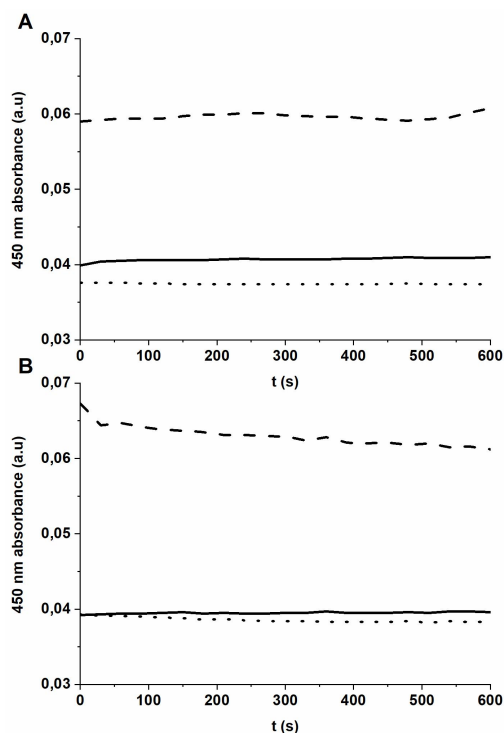


Figura 23 - Re-oxidação de MtAAOx com TtLPMO9H. MtAAOx no estado oxidado (15 uM, linha tracejada), MtAAOx no estado reduzido (linha pontilhada) e MtAAOx+TtLPMO9H (30 uM, linha sólida). Em A MtAAOx foi reduzida com álcool anisílico, e em B, com álcool veratrílico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados, no entanto, indicam que os álcoois veratrílico e anisílico estariam atuando como agentes redutores de TtLPMO9H, e de fato, a adição de TtLPMO9H aos álcoois levou a aparente aumento dos respectivos aldeídos (Figura 24).

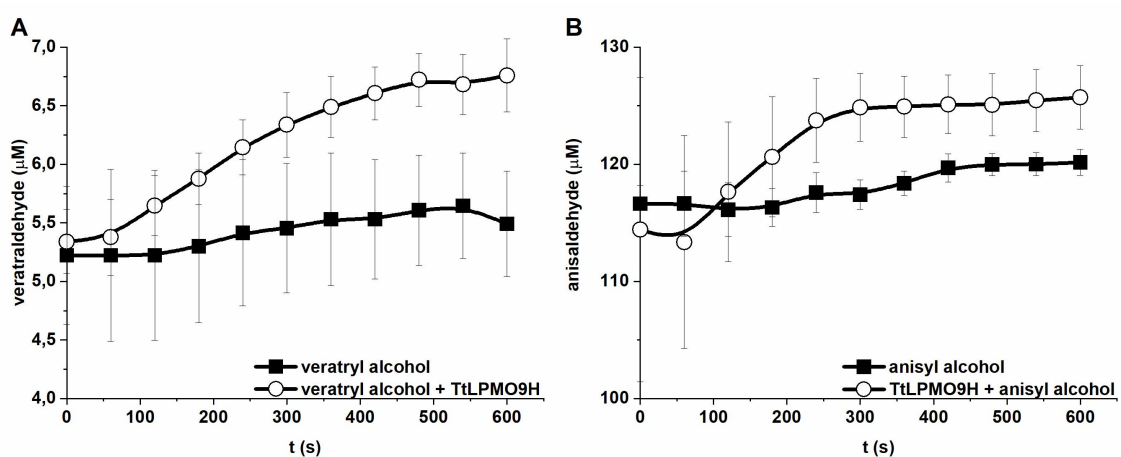


Figura 24 - Redução de TtLPMO9H por substratos de MtAAOx. Foram usados como agentes redutores álcool veratrílico (A) e álcool anisílico (B). A atividade oxidásica de TtLPMO9H com esses substratos foi medida pela absorvância dos aldeídos.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.3.2 Ativação de LPMOs por MtCDH e MtGLOX

Como os resultados dos experimentos com LPMO e AAOx foram bem-sucedidos na geração de celo-oligossacarídeos solúveis, e ficou evidente a importância de AAOx como produtora de  $H_2O_2$ , a atenção foi voltada para outras duas enzimas.

A primeira enzima de interesse foi MtCDH, uma celobiose desidrogenase que também tem atividade de oxidase, e pertence à mesma família que MtAAOx. Como pode ser observado na Figura 25, a combinação entre LPMO e MtCDH levou a formação de produtos oxidados. No entanto, a introdução de desta CDH ao sistema dificulta a atribuição dos produtos às enzimas, pois ambas geram produtos com oxidações em no carbono C1. Pode-se também notar que os picos relativos a produtos C4-oxidados ficaram muito menos proeminentes do que em outros sistemas de redução, pois com a ação da CDH, passaram a ser duplo oxidados, o que aumenta o tempo de retenção. Além disso, na presença de celobiose parece acontecer um deslocamento de duplo oxidado (Figura 25A). Pode-se interpretar que na ausência de seu substrato preferencial (celobiose), MtCDH oxida celo-oligossacarídeos de todos os tamanhos, incluindo C4-oxidados de DPs maiores, que possuem maior tempo de retenção.<sup>143</sup>

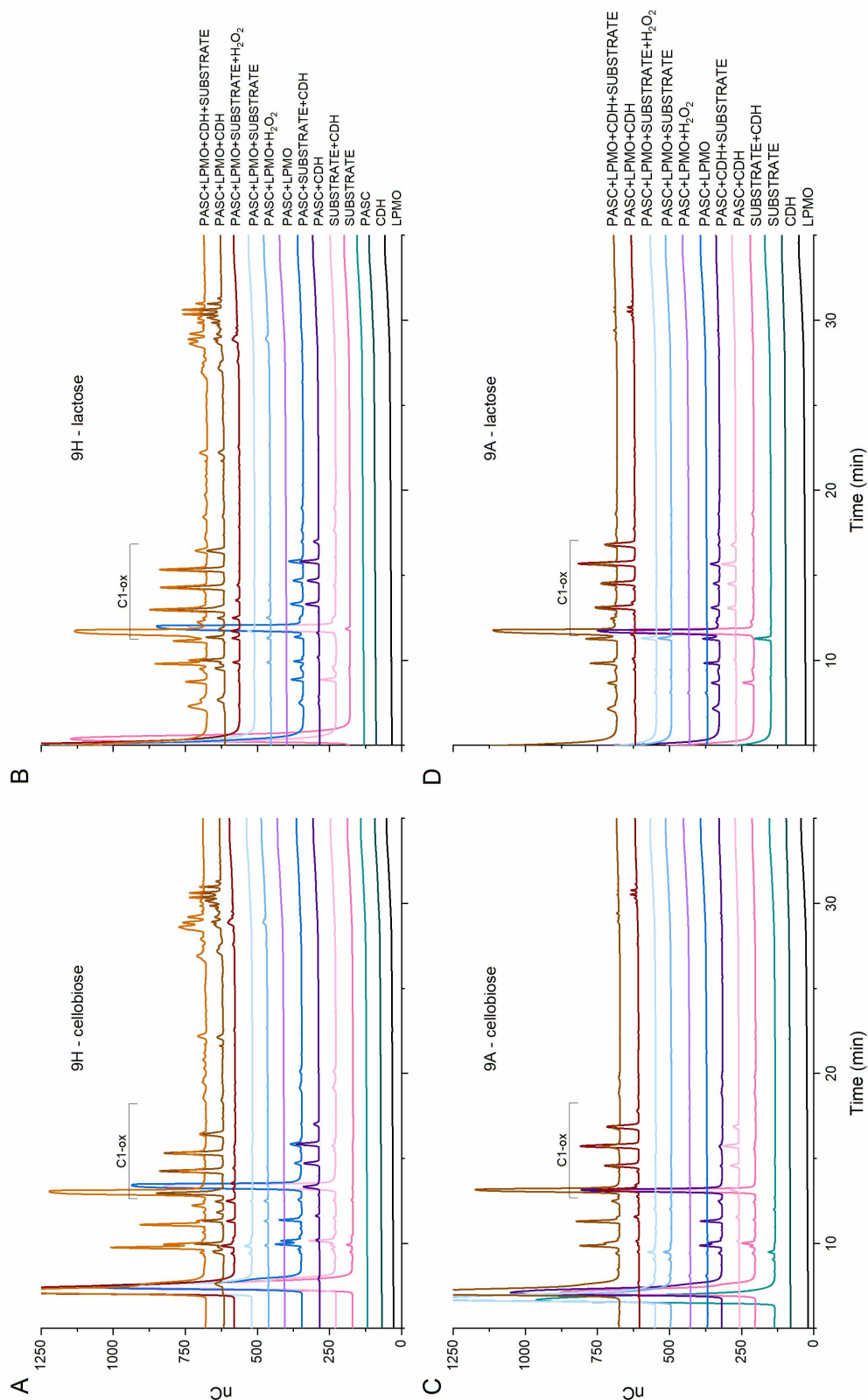


Figura 25 - Análise de produtos liberados em reações com LPMO e CDH. Em A e B, produtos de LPMO9H, e em C e D, de LPMO9A. “Substrate” se refere ao substrato da CDH, sendo cellobiose (A e C) ou lactose (B e D). A graduação dos eixos é a mesma para todos os gráficos, assim como a ordem das curvas. A legenda de cada curva se encontra à direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

É interessante também notar que MtCDH gerou produtos a partir de PASC. Nas reações com LPMOs, mesmo quando celobiose ou lactose não foram adicionados às reações como substratos de MtCDH, ocorreu a formação de produtos de LPMO.

Também foi investigada a enzima MtGLOX como possível doadora de elétrons e/ou  $H_2O_2$ . Podemos observar na Figura 26 que MtGLOX foi uma boa parceira para LPMOs pois sua adição resultou na liberação de celo-oligossacarídeos não modificados, assim como de oxidados pelas LPMOs.

Nos cromatogramas podemos também observar, nas curvas controle, que a adição de  $H_2O_2$  às misturas com PASC, LPMO e celobiose/lactose/metilglioxal/hidroximetilfurfural também resultou na liberação de produtos solúveis. Também é interessante notar que o efeito da adição de  $H_2O_2$  foi mais pronunciado para TtLPMO9H do que para MtLPMO9A.

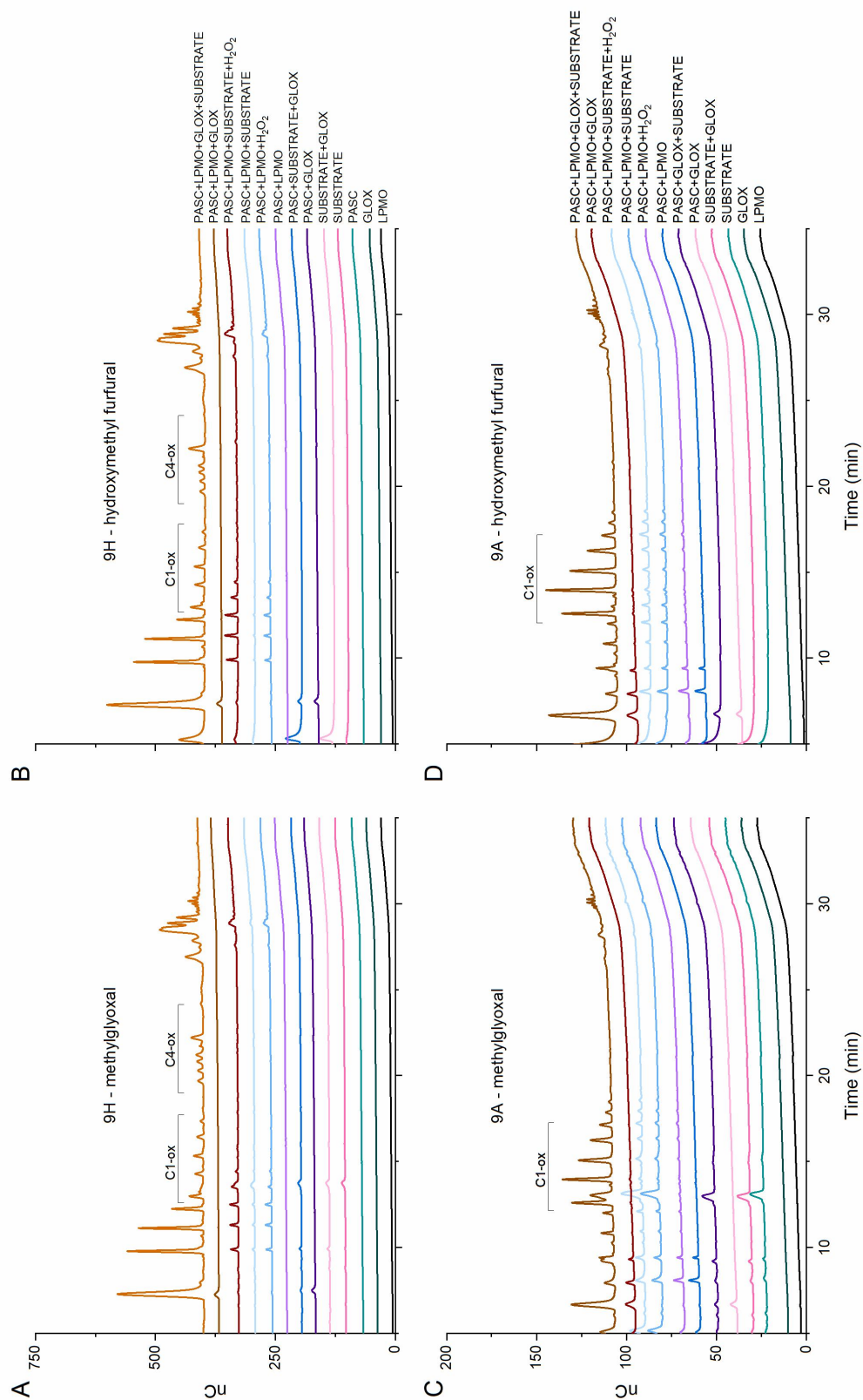


Figura 26 - Cromatogramas de produtos liberados em reações com LPMO e GLOX. Em A e B, produtos de LPMO9H, e em C e D, de LPMO9A. “Substrate” se refere ao substrato de MtGLOX, sendo metilglioxal (A e C) ou hidróximetilfurfural (B e D). A graduação dos eixos é a mesma para todos os gráficos, assim como a ordem das curvas. A legenda de cada curva se encontra à direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A atividade de LPMOs depende da redução de seu íon  $\text{Cu}^{2+}$  presente no sítio catalítico de cada molécula. Além disso, oxigênio também é necessário. A origem do oxigênio a ser usado por uma LPMO é alvo de discussão entre os pesquisadores. Até poucos anos atrás acreditava-se que  $\text{O}_2$  era a fonte de oxigênio, mas desde então evidências apontam que esse papel é feito por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>36</sup>

As evidências de que  $\text{H}_2\text{O}_2$  é o co-substrato de LPMOs são especialmente interessantes, pois é conhecido que muitas espécies fúngicas possuem em seus genomas genes que codificam oxidoreduases de diversas famílias AAs, muitas das quais são oxidases, produtoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso, já foi mostrada a co-ocorrência de genes *gmc* e *lpmo* em muitos organismos.<sup>70</sup> CDHs são enzimas da família GMC estudadas há muitos anos, e sua atuação em conjunto com LPMOs também é conhecida desde a descoberta dessas últimas. No entanto, a combinação de LPMOs com oxidoreduases ainda é limitada. Além disso, nenhum estudo mostrou que o par LPMO-AAO era capaz de gerar produtos oxidados a partir de substratos celulósicos. Esta combinação enzimática é bastante interessante, tendo em vista que em certos organismos, a expressão de AAO foi observada nos estágios mais avançados de degradação de biomassa, ou seja, concomitante às hidrolases.<sup>144</sup>

Uma das vantagens da utilização de AAOs é que estas enzimas não têm atividade em celo-oligossacarídeos. Portanto, todos os produtos oxidados detectados resultam da ação de LPMOs. A investigação destas enzimas também é de interesse pois como são produtoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  frequentemente são associadas, indiretamente, à degradação de lignina, sendo que alguns de seus substratos provêm desse processo.<sup>145</sup>

Os resultados obtidos mostraram que a atividade de MtAAOx estimulou a atividade de TtLPMO9H, evidenciada pela detecção de celo-oligossacarídeos oxidados. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido foi de crucial importância, pois é co-substrato da LPMO. A produção *in situ* de  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultou em lento acúmulo de produtos de LPMO durante as primeiras horas de reação; no entanto, quando tempos mais longos foram considerados, o sistema enzimático obteve resultado equivalente à quantidade 300 vezes maior de ácido ascórbico. O acúmulo mais lento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  provavelmente evitou inativação prematura da LPMO, assim como a adição de catalase em baixa concentração melhorou a performance da LPMO, possivelmente pelo consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  excessivo, dessa forma protegendo a LPMO contra danos oxidativos.

É bem conhecido que as histidinas que coordenam o cobre podem sofrer oxidação, o que resulta em inativação da LPMO.<sup>36</sup>

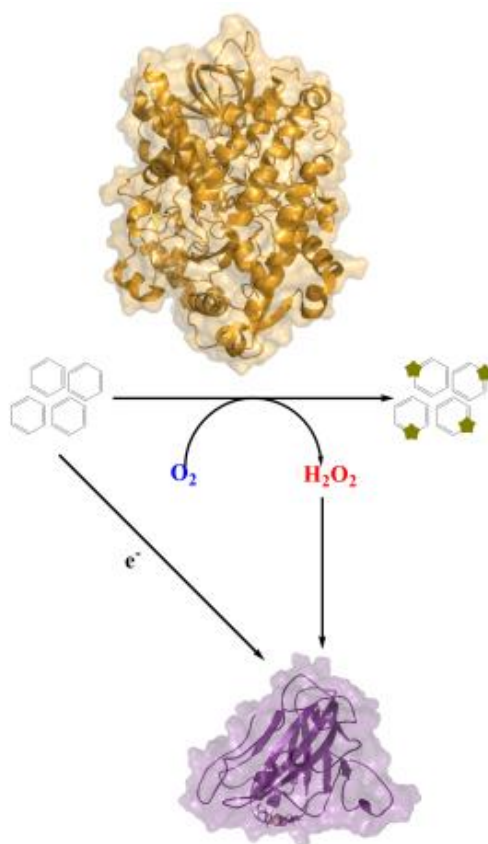


Figura 27 - Esquema de sistema LPMO-AAO. MtAAOx (estrutura em amarelo) oxida álcoois aromáticos, com a concomitante produção de  $H_2O_2$ . TtLPMO9H (modelo estrutural em roxo) seria reduzida pelo substrato de MtAAOx (ou pelo seu produto), e usaria o  $H_2O_2$  para catalisar a inserção de oxigênio na posição C1 ou C4 de um resíduo na cadeia celulósica, causando a quebra da cadeia. Estrutura de MtAAOx tem código 6O9N no PDB. O modelo estrutural de TtLPMO9H foi construído usando o servidor online AlphaFold Colab.<sup>146</sup>

Fonte: Elaborada pela autora.

Ademais, os resultados obtidos indicam que os álcoois veratrílico e anisílico podem funcionar como doadores de elétrons para as LPMOs testadas. Celo-oligossacarídeos solúveis não foram detectados quando os álcoois veratrílico ou anisílico foram adicionados às reações com LPMOs. Duas possibilidades podem ser levantadas, que envolvem a formação de  $H_2O_2$ : esses álcoois aromáticos não reagem facilmente com íons cobre (como acontece, por exemplo, com ácido ascórbico) livres em solução, e, portanto, não formam  $H_2O_2$ . Ou não são bons agentes redutores, e, portanto, as LPMOs não ligadas ao substrato não entram no chamado “ciclo fútil” que também resulta em  $H_2O_2$ .

É ainda interessante que MtAAOx tenha ativado as duas LPMOs usadas neste estudo, enquanto o único outro publicado com AAO não tenha observado atividade com a

LPMO usada.<sup>82</sup> Foi sugerido que a afinidade das enzimas por oxigênio poderia ser um fator que influenciava no funcionamento do sistema enzimático, pela observação que somente as desidrogenases tinham estimulado a ativação das LPMOs. Isso pode ter de fato exercido papel nos resultados observados neste estudo: MtAAOx mostrou afinidade por O<sub>2</sub> muito inferior à AAOs previamente caracterizadas.<sup>140</sup> No entanto, os resultados obtidos sugerem que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teve papel central na ativação da LPMO.

Os cromatogramas das reações nas quais MtCDH esteve presente como parceira das LPMOs mostraram a formação de celo-oligossacarídeos oxidados, mas não é possível inferir a contribuição de cada enzima, dada a complexidade dos produtos. Foi interessante que mesmo sem a adição de substrato para a CDH (celobiose ou lactose), produtos foram formados. Isso sugere que a CDH pode ter utilizado PASC como seu substrato, como já foram reportadas algumas vezes a oxidação de terminais redutores de fibras celulósicas.<sup>147</sup> Além disso, foi notável a diferença entre os perfis de produtos quando o substrato da CDH foi ou não adicionado. Nas reações com celobiose ou lactose (substratos preferenciais), os picos correspondentes a celo-oligossacarídeos com maior grau de polimerização são menos proeminentes do que os que foram detectados nas reações sem um dos substratos preferenciais. Isso indica que a CDH oxidou os oligossacarídeos de maior grau de polimerização que foram sendo solubilizados pela ação das LPMOs. MtCDH tem considerável atividade de oxidase, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado por ela certamente contribuiu para estimular as LPMOs.

A adição de MtGLOX às reações com LPMOs, de maneira similar a MtCDH e MtAAOx, também resultou na solubilização de celo-oligossacarídeos. As oxidases da família AA5, à qual MtGLOX pertence, atuam sobre uma variedade de substratos, entre eles sacarídeos, álcoois alifáticos, aromáticos e aldeídos.<sup>148</sup> Assim como AAOs, glioxal oxidases frequentemente têm sua função associada à degradação de lignina por peroxidases (pertencentes à família AA2). Contudo, é tentador contemplar outras funções para MtGLOX, levando em consideração a ausência das peroxidases geralmente associadas (um único gene codificante para enzima AA2) e dezenas de genes codificantes para LPMOs no genoma de *T. thermophilus*.

É conhecido que CDHs interagem com LPMOs<sup>74</sup> e são capazes de reduzi-las através de transferência direta entre essas moléculas, por aproximação entre o cobre da LPMO e o citocromo da CDH.<sup>74, 80</sup> Portanto é razoável supor que no sistema testado MtCDH foi a



enzima redutora de LPMO. Apesar das outras duas enzimas auxiliares utilizadas não possuírem domínio citocromo, ativação de duas LPMOs foi observada. Isso pode estar mais relacionado à capacidade dessas enzimas de produzirem  $H_2O_2$  do que à redução direta da LPMO pela enzima, visto que a adição de  $H_2O_2$  resultou em produtos da mesma maneira. Apesar de não ter sido investigada, transferência direta de elétrons entre as enzimas não pode ser descartada, especialmente se a acessibilidade dos cofatores for considerada.<sup>87</sup> Enquanto o FAD de MtAAOx é completamente acessível ao solvente,<sup>140</sup> MtGLOX, assim como LPMOs, tem seu íon cobre na superfície da enzima.<sup>141</sup>

É de interesse que as duas LPMOs usadas, 9A e 9H, tiveram atividade com as oxidases usadas, assim como com a CDH. Com a descoberta da ação peroxigenásica das LPMOs, o papel das oxidoreduções como enzimas auxiliares somente da degradação de lignina é justamente questionado.<sup>86</sup> Surge, portanto, uma nova função para as oxidoreduções AAO e GLOX. Aqui, AAO foi pela primeira vez usada com sucesso na ativação de LPMOs. Similarmente, também é a primeira vez que uma enzima da família AA5 é usada com esse propósito. Dessa maneira, o leque de enzimas parceiras para as LPMOs foi ampliado, e espera-se que seja aprofundado e explorado para potenciais aplicações biotecnológicas das LPMOs.



## 5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: REDUTOR DE LPMO?

---

### 5.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento atual sobre LPMOs indica que deve ocorrer a redução da enzima, de LPMO-Cu<sup>2+</sup> para LPMO-Cu<sup>+</sup>) para que a LPMO seja ativada. É também amplamente conhecida a promiscuidade das LPMOs quanto aos agentes redutores.<sup>70, 72</sup>

De acordo com o que vem sendo aceito desde 2017, após ser reduzida, as LPMOs utilizam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para introduzir um oxigênio na cadeia polimérica, em carbono C1 ou em C4, o que resulta na quebra da cadeia. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa de muitos processos em uma reação com LPMOs: é co-substrato da LPMO, mas pode também ser produzido pela enzima ou por reações envolvendo agentes redutores; pode inibir LPMO, assim como atuar como reoxidante (LPMO-Cu<sup>+</sup> a LPMO-Cu<sup>2+</sup>).<sup>63</sup>

Levando em consideração que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode atuar como pro- ou antioxidante, dependendo das circunstâncias, foi investigado se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia por si só, levar à liberação de produtos oxidados pela LPMO.

### 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.2.1 Enzimas e reagentes

As enzimas TtLPMO9H e MtLPMO9A foram produzidas e purificadas como descrito nos capítulos anteriores, com modificação na etapa de (re)saturação com cobre. Para evitar excesso de cobre em solução, concentração molar de CuSO<sub>4</sub> igual à de enzima foi adicionada, e a solução foi incubada, em gelo, por 30 minutos. O excesso de cobre foi removido aplicando a solução em coluna HiTrap Desalting 5 ml (GE Healthcare).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi preparado na concentração de uso, aliquoteado, e mantido congelado a -20 °C. Ácido gálico (Sigma Aldrich) foi preparado e armazenado da mesma forma. Antes de cada experimento novas alíquotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ácido gálico foram descongeladas, mantidas em gelo e no escuro até uso. PASC foi preparado como descrito.<sup>111</sup>

### 5.2.2 Produtos de reações com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O efeito da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliado em reações com 50 mM tampão McIlvaine nos pHs 5.0, 7.0 e 8.0, substrato 0.2% PASC e 2 μM LPMO. As reações foram iniciadas com a adição de 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e incubadas a 50 °C, com agitação de 1000 rpm em ThermomixerC (Eppendorf). Após 24 horas as reações foram retiradas, fervidas por 10 minutos, centrifugadas para separar o substrato insolúvel residual, e o sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa com corte 0.22 μm. Os oligossacarídeos solúveis foram detectados por HPAEC-PAD, como descrito no capítulo anterior. Todas as reações foram feitas e analisadas desta forma, a menos que especificado.

É importante observar que em reações com LPMOs, a ordem de adição dos reagentes importa, pois certas combinações podem inativar a LPMO em segundos.<sup>64</sup> A enzima nunca foi incubada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem a presença do substrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sempre foi adicionado por último, para iniciar a reação.

### 5.2.3 Efeito de açúcares redutores

Foram utilizadas as mesmas condições usadas nos experimentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com a adição de 0-10 mM de celobiose, xilobiose ou sacarose (todos Sigma-Aldrich).

### 5.2.4 Efeito de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ácido gálico

Foram utilizadas as mesmas condições usadas nos experimentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em experimentos com substratos diferentes de PASC, foi utilizado suspensão de Avicel para concentração final de 5%, ou 0.2% xiloglucano de semente de tamarindo (Megazyme). Ácido gálico foi adicionado para concentração final de 0.1 ou 1 mM.

### 5.2.5 Estado redox de TtLPMO9H

O estado redox do cobre de TtLPMO9H foi por fluorescência intrínseca da proteína. Como proposto, a redução do cobre resulta em aumento da fluorescência, em relação à fluorescência observada quando a enzima está no estado oxidado.<sup>88</sup> O espectro de emissão entre 300 nm e 400 nm, com 272 nm como comprimento de excitação. As medidas foram só de 2.5 μM de TtLPMO9H, da LPMO com 100 μM de ácido gálico e da LPMO com 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foram feitas triplicatas de cada condição, em microplaca preta de 96 poços (Greiner Bio-One), em espectrofotômetro M200 Pro (TECAN).

### 5.3 RESULTADOS

O capítulo anterior mostrou como a atividade de *Tt*LPMO9H é dependente do co-substrato  $H_2O_2$ , como demonstrado pela sua atividade na presença de enzimas auxiliares com atividade de oxidase.

Durante os ensaios com os substratos das oxidoredutases, inesperadamente, produtos de atividade de *Tt*LPMO9H em PASC foram detectados (Figura 28A) em reações controle com  $H_2O_2$ . Os perfis de produtos foram semelhantes aos observados em condições consideradas comuns (com adição de ácido ascórbico, aeróbicas). Celo-oligossacarídeos oxidados, produtos de *Mt*LPMO9A em PASC, também foram detectados (Figura 28B).

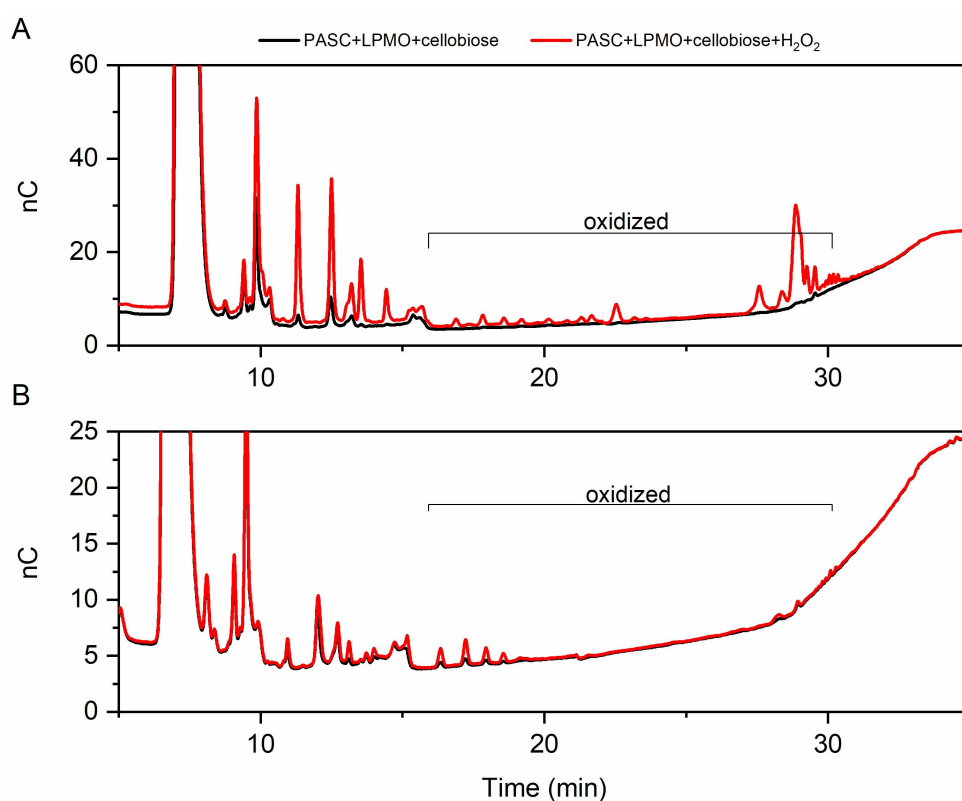


Figura 28 - Perfis de produtos de LPMO com cellobiose e  $H_2O_2$ . Em A, perfil de produtos liberados por *Tt*LPMO9H, e em B, por *Mt*LPMO9A. Às reações foram adicionados 5 mM de cellobiose e 25  $\mu$ M  $H_2O_2$ . Os perfis mostram os produtos solubilizados acumulados por 24 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para certificar que o observado não era resultado de reação entre cobre residual e  $H_2O_2$  (reação tipo Fenton), esta possibilidade foi avaliada em três pHs de reação. Os resultados (Figura 29) indicam que as espécies oxidativas formadas não liberaram celo-oligossacarídeos, ou seja, confirmou que os produtos detectados provavelmente foram resultados de ação enzimática, e não de processos independentes das LPMOs.

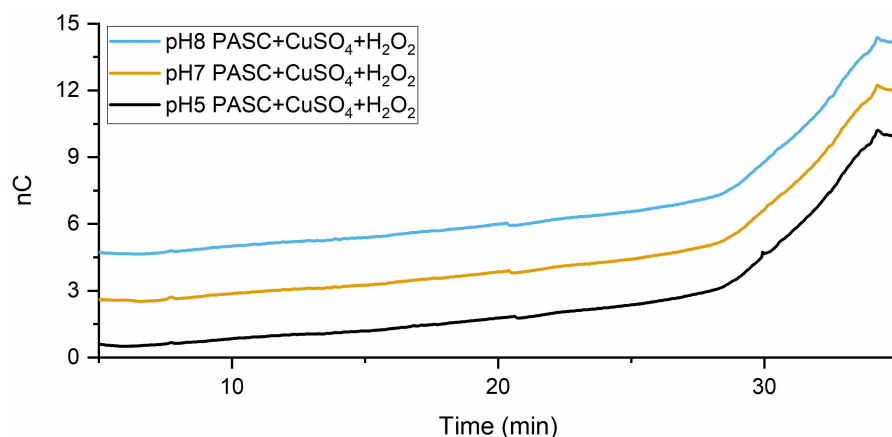


Figura 29 - Reações controle entre CuSO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Espécies reativas formadas não levaram à formação de celo-oligossacarídeos nas condições avaliadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Enquanto a formação de produtos em reações com hidróximetil furfural e metilglioxal não foi muito surpreendente pois produtos estavam sendo acumulados em condições aeróbicas, a presença de produtos oxidados em reações com dissacarídeos foi inesperada.

Esses resultados levantaram a questão de como as LPMOs estariam sendo reduzidas. Inicialmente a possibilidade considerada foi que celobiose e lactose estariam atuando como agentes redutores, ou seja, que açúcares redutores (i.e. reduzem cobre) poderiam atuar como redutores de LPMOs. Tal cenário seria muito interessante dado o contexto de atuação de LPMOs em conjunto com celulasas. Subsequentemente, foi investigado o efeito da adição de açúcares redutores (celobiose e xilobiose) e não-redutor (sacarose) às reações de LPMO com PASC. Como mostrado na Figura 30A, a variação da concentração de celobiose adicionada quase não teve efeito em pH 5.0 (relevante em um contexto com celulasas). Em reações em pH 7.0 (Figura 30B), a quantidade de produtos detectados foi maior; ainda assim, a variação na concentração de celobiose não teve efeito na quantidade de produtos totais.

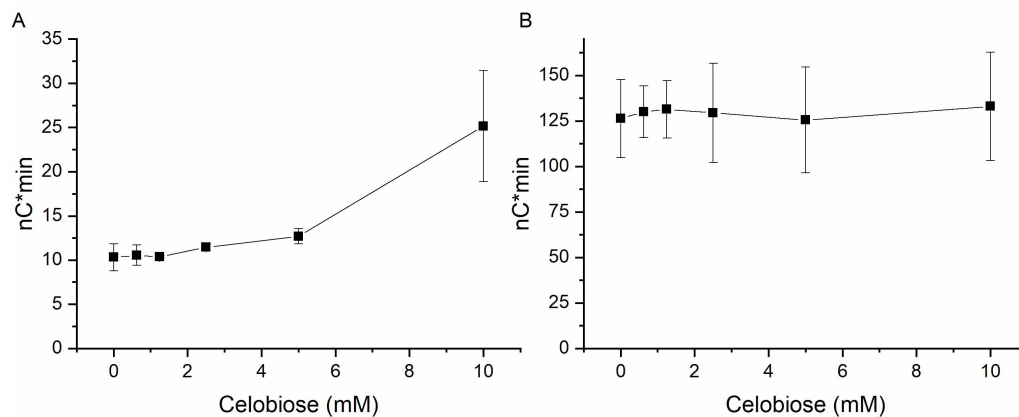


Figura 30 - Resposta de TtLPMO9H em PASC à variação da concentração de celobiose em tampões pHs 5.0 (A) e 7.0 (B). As áreas em nC\*min representam a soma das áreas de produtos não oxidados, oxidados em C1, em C4, e em ambas as extremidades dos oligossacarídeos solubilizados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Alteração do tipo de açúcar redutor para xilobiose (Figura 31C), ou para açúcar não redutor, sacarose (Figura 31D), também não permitiu confirmar a suposição inicial.

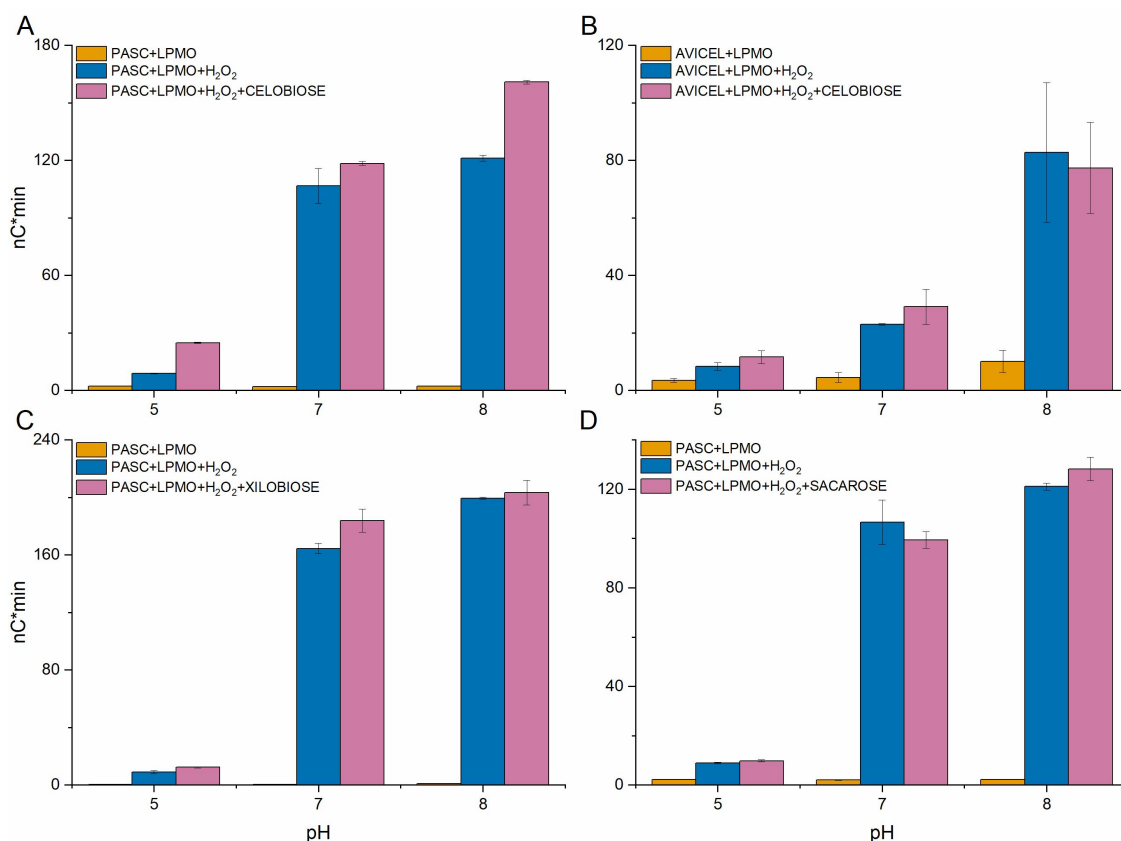


Figura 31 - Resposta de TtLPMO9H a três dissacarídeos adicionados às reações em substratos celulósicos em três pHs. Celobiose foi adicionada a reações com PASC (A) e Avicel (B) como substratos de TtLPMO9H. PASC também foi o substrato em reação com adição de xilobiose (C) e sacarose (D). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado para concentração final de 100  $\mu$ M.

Fonte: Elaborada pela autora

Apesar dos resultados obtidos não terem informado a respeito dos dissacarídeos como açúcares redutores, eles informaram que o pH realmente cumpria um papel importante: dependendo do pH, a adição de  $H_2O_2$  às reações que continham somente LPMO e substrato celulósico, já era o suficiente para a atividade de TtLPMO9H e liberação de celo-oligossacarídeos oxidados.

Uma nova análise de resultados obtidos na investigação de TtLPMO9H com oxidoreduzases mostrou que reações com HMF, MTG, celobiose e lactose com a adição de  $H_2O_2$  resultavam, curiosamente, em perfis de produtos solúveis quase iguais, com picos de intensidades muito parecidas, independentes do composto adicionado (Figura 32B). Isso era bastante interessante, dado que sem a adição de  $H_2O_2$  (aeróbicas comuns), os perfis de produtos eram diferentes (Figura 32A).

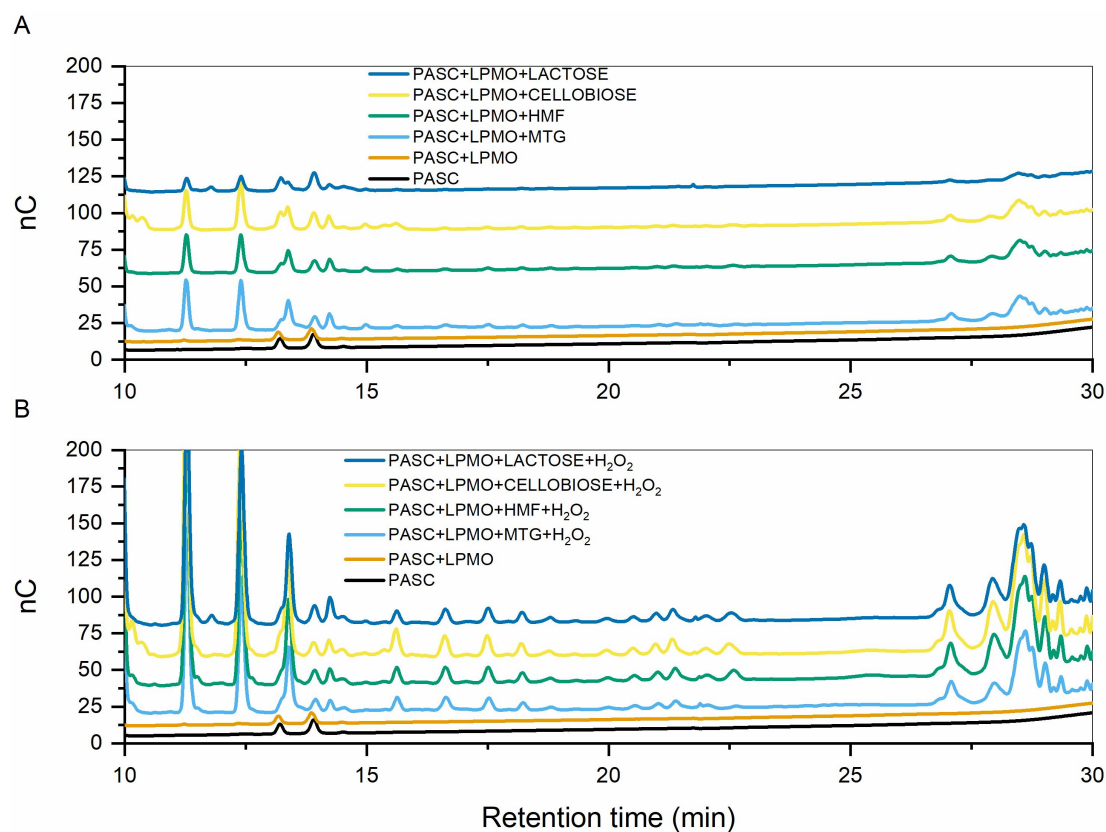


Figura 32 - Comparação dos produtos formados com e sem adição de  $H_2O_2$ . Cromatogramas de produtos de TtLPMO9H em PASC com substratos de MtCDH e MtGLOX (reações controle do capítulo anterior), em condições aeróbicas comuns (A) e com adição de  $25\mu M H_2O_2$  (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

Juntos, esses resultados sugerem que  $H_2O_2$  era o principal componente afetando as reações de TtLPMO9H, e que o pH de reação também era de grande importância. Assim, o papel desses componentes foi investigado mais de perto.



Primeiramente foi verificado se o efeito de  $H_2O_2$  em reações em diferentes pHs se repetia com outra LPMO e outros substratos polissacarídicos. Os perfis de produtos detectados podem ser observados na Figura 33.

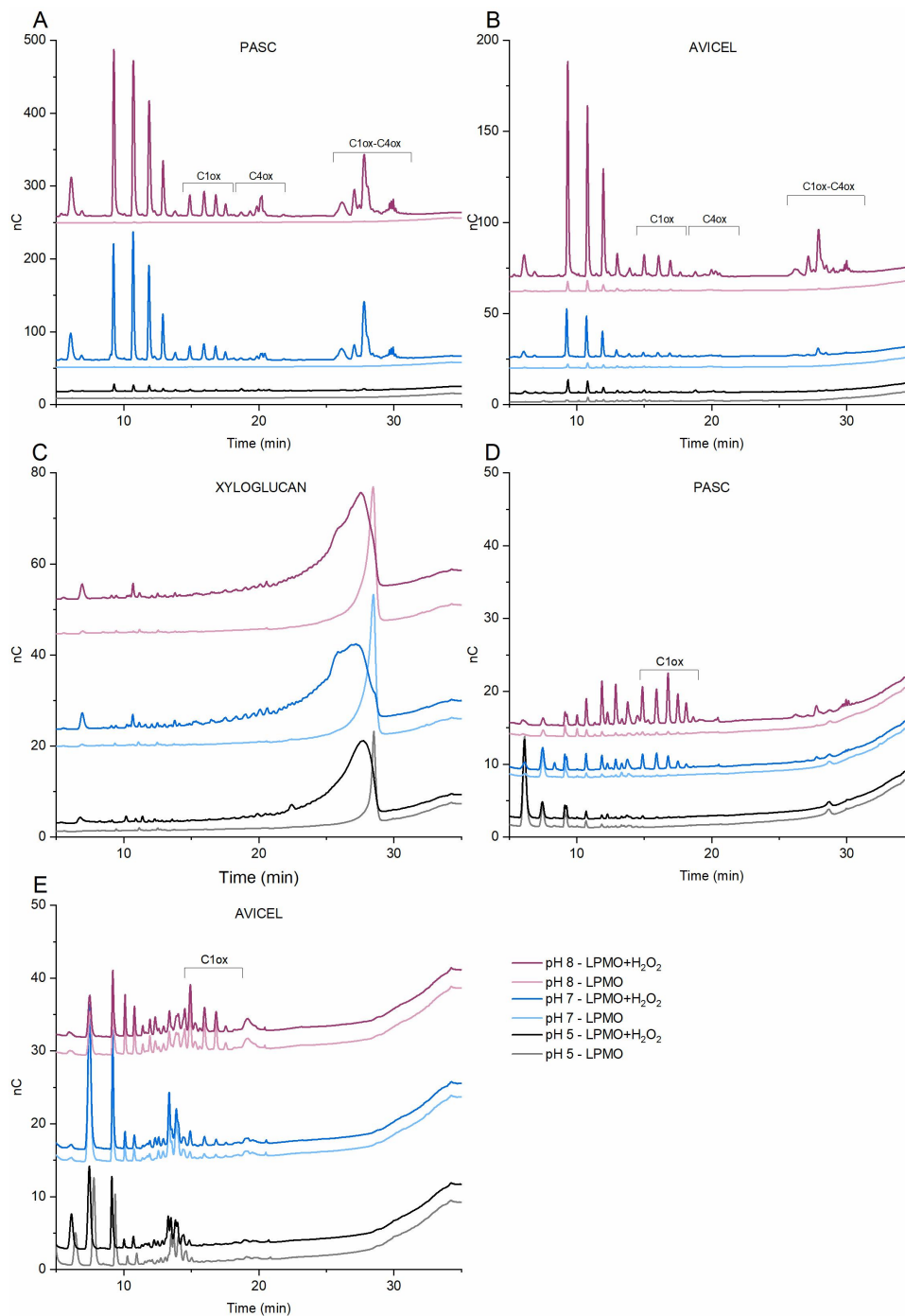


Figura 33 - Cromatogramas de produtos de LPMOs com três substratos e variação de pH. Produtos de TiLPMO9H (A-C), (D-E) de MtLPMO9A. O substrato utilizado está indicado em cada um dos painéis, e são: (A e D) PASC, (B e E) AVICEL, e (C) xiloglucano. A legenda com o pH de reação e a presença ou não de  $H_2O_2$  está no último painel, e é a mesma para todos os gráficos. Os produtos oxidados de xiloglucano não foram indicados pois não existe padrões que possibilitassem identificação. A concentração final de  $H_2O_2$  adicionado foi  $100 \mu M$ .

Fonte: Elaborada pela autora.

Os cromatogramas acima mostram que enquanto reações em pH 5.0 foram pouco ativadas com a adição de  $H_2O_2$ , nas reações que aconteceram nos outros dois pHs os picos correspondentes aos produtos oxidados e não-oxidados são bastante intensos e bem definidos. Apesar de quantificação de produtos de oxidação de xiloglucano ser mais difícil em relação a substratos celulósicos, devido à falta de padrões, a Figura 33C indicou que TtLPMO9H teve atividade peroxigenásica, observada pela alteração na curva de produtos. Se a área total de cada curva for considerada (Figura 34) ficam aparentes as mudanças que ocorrem com os diferentes pHs e composições de reações.

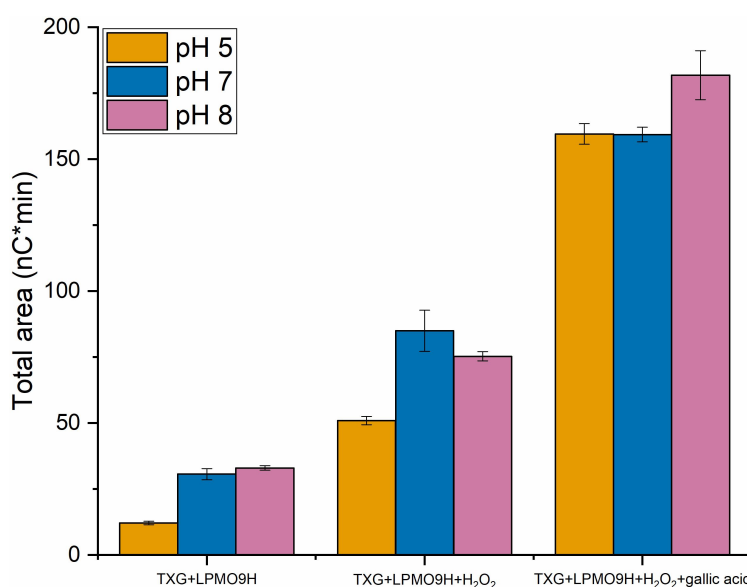


Figura 34 - Áreas dos produtos de TtLPMO9H em xiloglucan. As condições de reação variaram quanto ao pH do tampão, ausência ou presença de 100  $\mu$ M e 1 mM de ácido gálico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o gráfico mostra, aumento de pH de reação aumenta a área de produtos, assim como a adição de  $H_2O_2$  e ácido gálico.

Quanto aos substratos celulósicos, pode-se observar que a ativação por  $H_2O_2$  variou entre as LPMOs. Para TtLPMO9H em PASC o menor aumento foi de 8.5x, em pH 5.0, e o maior foi em pH 8.0, de aproximadamente 118x em relação à mesma reação sem adição de peróxido de hidrogênio. Para MtLPMO9A o maior aumento também foi observado no pH mais alcalino; este aumento, no entanto foi somente de 4.2x. Quando Avicel foi usado como substrato o aumento na quantidade total de produtos foi muito menor com TtLPMO9H, com máximo de 7.6x em pH 8.0. Reações equivalentes com MtLPMO9A não resultaram em aumento expressivo em nenhum dos três pHs testados.

As mesmas condições também foram avaliadas com adição de 1 mM de ácido gálico (além de  $H_2O_2$ ), agente redutor escolhido por não resultar em produção de  $H_2O_2$  através de reações extra-enzimáticas. Com o substrato PASC, a adição de excesso (de 10x a concentração de  $H_2O_2$ ) de ácido gálico resultou em aumentos das áreas totais de 8.4, 15.3 e 7.0x, nos pHs 5, 7 e 8.0 respectivamente, de produtos solubilizados por MtLPMO9A (Figura 36A). Por outro lado, a enzima TtLPMO9H registrou aumento de 5.1x em pH 5.0; nos outros dois pHs, em resposta à adição de ácido gálico não foi observado aumento de área de produtos totais (Figura 35A). Em resumo: para TtLPMO9H os maiores ganhos resultaram da adição de  $H_2O_2$ , enquanto para MtLPMO9A, da adição de ácido gálico.

Quando Avicel foi usado como substrato (Figura 35C e 36C) das LPMOs, o cenário mudou: os maiores ganhos foram proporcionados por ácido gálico, em reações que aconteceram em pH 7.0, sendo de aproximadamente 12x e 24x com MtLPMO9A e TtLPMO9H, respectivamente, em relação às reações somente com  $H_2O_2$ .

Se o tipo de produto for levado em consideração (Figura 35 e 36B e D), os maiores aumentos resultantes de presença de ácido gálico ocorreram em pH 5.0, com ganho de 8.9x área de produtos duplo-oxidados de TtLPMO9H, e de 76.3x área de produtos oxidados em C1 por MtLPMO9A, quando PASC foi o substrato.

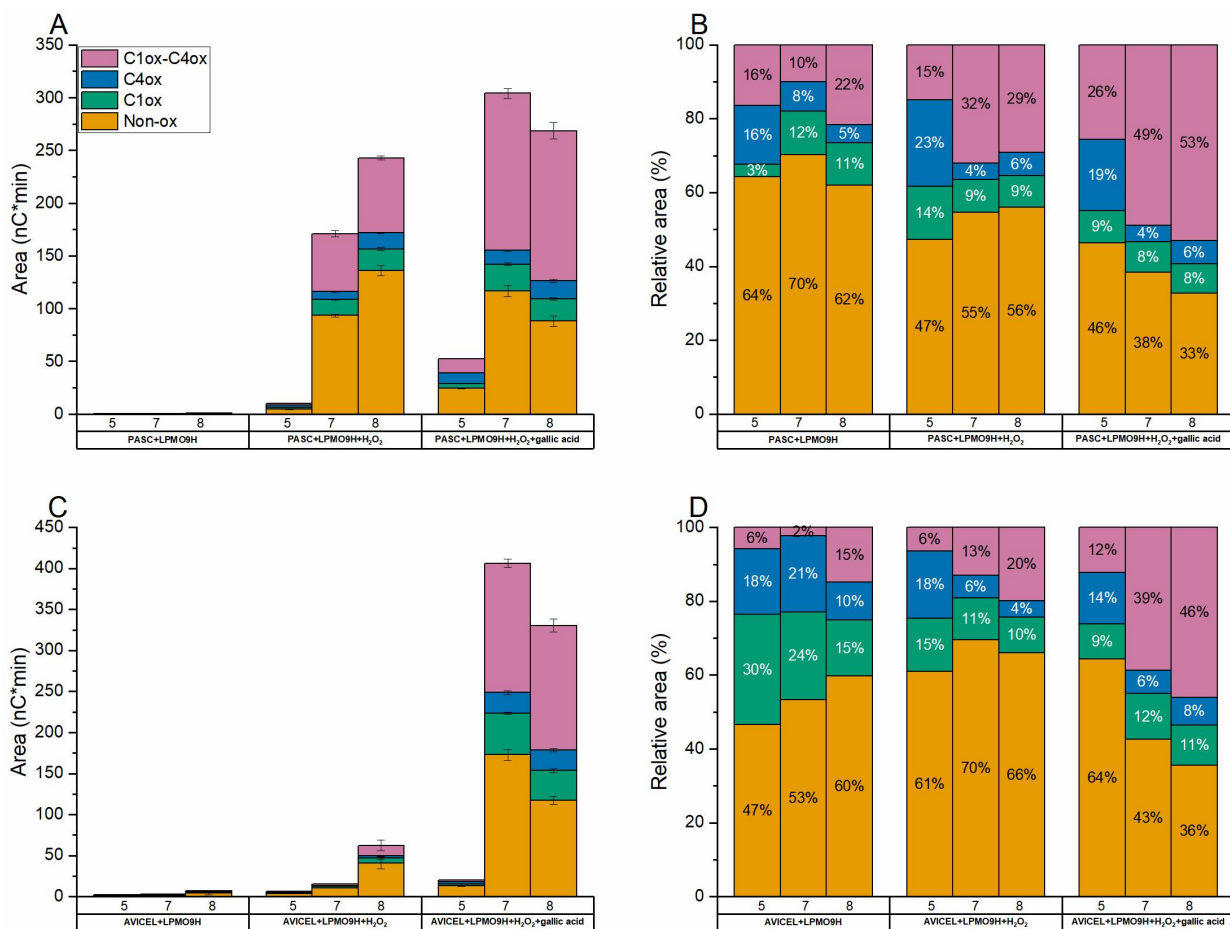


Figura 35 - Áreas de produtos liberados por TiLPMO9H em PASC (A e B) e Avicel (C e D). A e C mostram as áreas totais, com as áreas empilhadas por tipo de produto. Em B e D, as mesmas áreas estão representadas como áreas relativas. As legendas e disposição das reações e pHs são as mesmas nos quatro painéis.

Fonte: Elaborada pela autora.

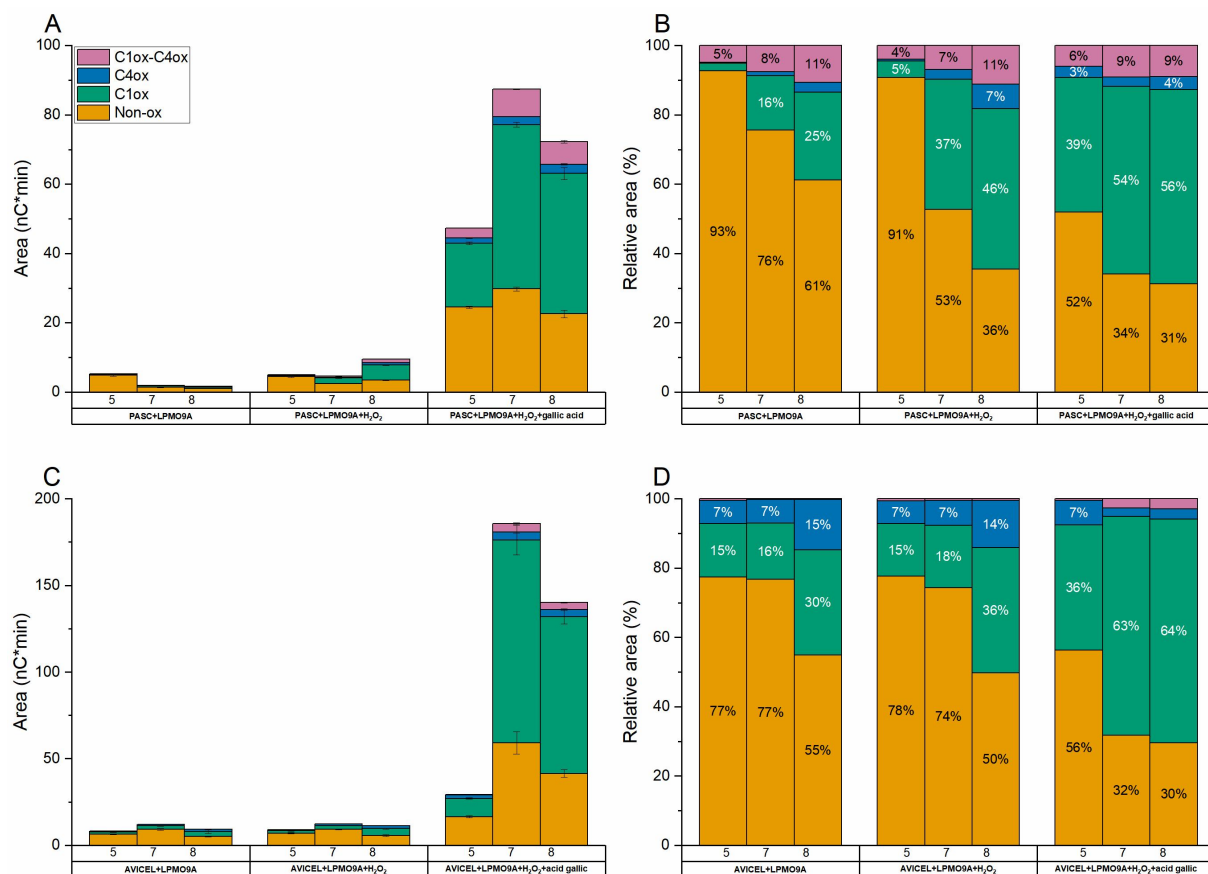


Figura 36 - Áreas de produtos liberados por MtLPMO9A em PASC (A e B) e Avicel (C e D). A e C mostram as áreas totais, com as áreas empilhadas por tipo de produto. Em B e D, as mesmas áreas estão representadas como áreas relativas. As legendas e disposição das reações e pHs são as mesmas nos quatro painéis.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando a concentração de ácido gálico adicionado foi reduzida dez vezes, igualando a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e o efeito individual de cada um foi comparado, pode-se observar que ácido gálico propiciou maior acúmulo de celo-oligossacarídeos, em pHs 7.0 e 8.0 (Figura 37A). O acúmulo não teve aumento, no entanto, quando os dois componentes foram adicionados simultaneamente. Curiosamente, em reações que aconteceram em tampão de pH 5.0, a adição de ácido gálico resultou em menor área de produtos do que as reações às quais somente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado. Reações nesse mesmo pH foram as que mais se beneficiaram da adição dos dois componentes juntos.

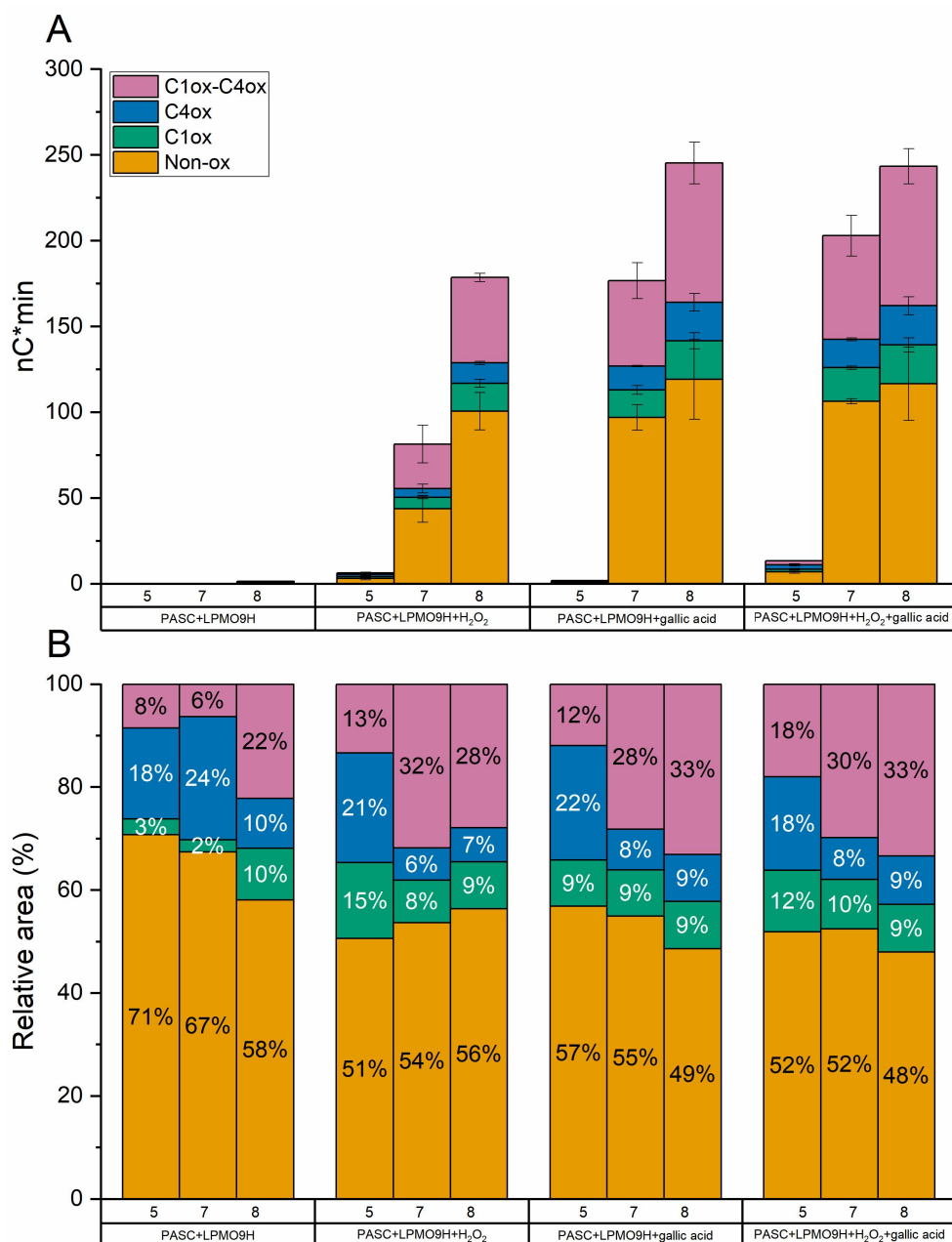


Figura 37 - Áreas de produtos liberados por TiLPMO9H em PASC. Em A está o gráfico com as áreas totais, representadas pelas áreas de cada tipo de produto empilhadas em colunas. Em B, a representação das mesmas áreas, mas normalizadas. Esta figura difere da anterior na quantidade de ácido gálico que foi adicionado, de 100  $\mu$ M ao invés de 1 mM, e na condição a mais de adição somente de ácido gálico. Os resultados refletem os produtos solúveis acumulados ao longo de 24 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Também é interessante notar as proporções relativas de cada produto dependendo da condição (Figura 37B). A adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido gálico ou ambos juntos não parece ter grande efeito na composição por cada tipo de produto. No entanto, fica bastante clara a influência do pH: em pH ácido maior porcentagem da área total das curvas cromatográficas corresponde a produtos com oxidação no carbono C4, enquanto a porcentagem correspondente a área de produtos oxidados no carbono C1 permanece praticamente constante.

Além disso, com o aumento do pH, a área correspondente a produtos de dupla oxidação também aumenta.

Por fim, foi avaliado o efeito da concentração de  $H_2O_2$  às reações, nos três pHs que já vinham sendo testados, e com PASC como substrato (Figura 38). Em cada um dos pHs avaliados (Figura 38A-C) o aumento de  $H_2O_2$  até 100  $\mu M$  resultou em aumento na área total de produtos, e segue o que já tinha sido anteriormente observado, ou seja, que o pH 8.0 foi o que resultou em maior quantidade de produtos. Concentrações acima de 100  $\mu M$  resultaram em diminuição de produtos, sendo que na concentração máxima avaliada, de 500  $\mu M$ , a área dos produtos foi equivalente ou inferior as áreas calculadas com dez vezes menos  $H_2O_2$ .

Além disso, nos gráficos de áreas relativas (Figura 38D-E), fica de novo evidente que o pH 5.0 é o qual resulta em maior proporção de celo-oligosacarídeos oxidados em C4. Nas outras condições de pH as proporções dos produtos permanecem quase constantes

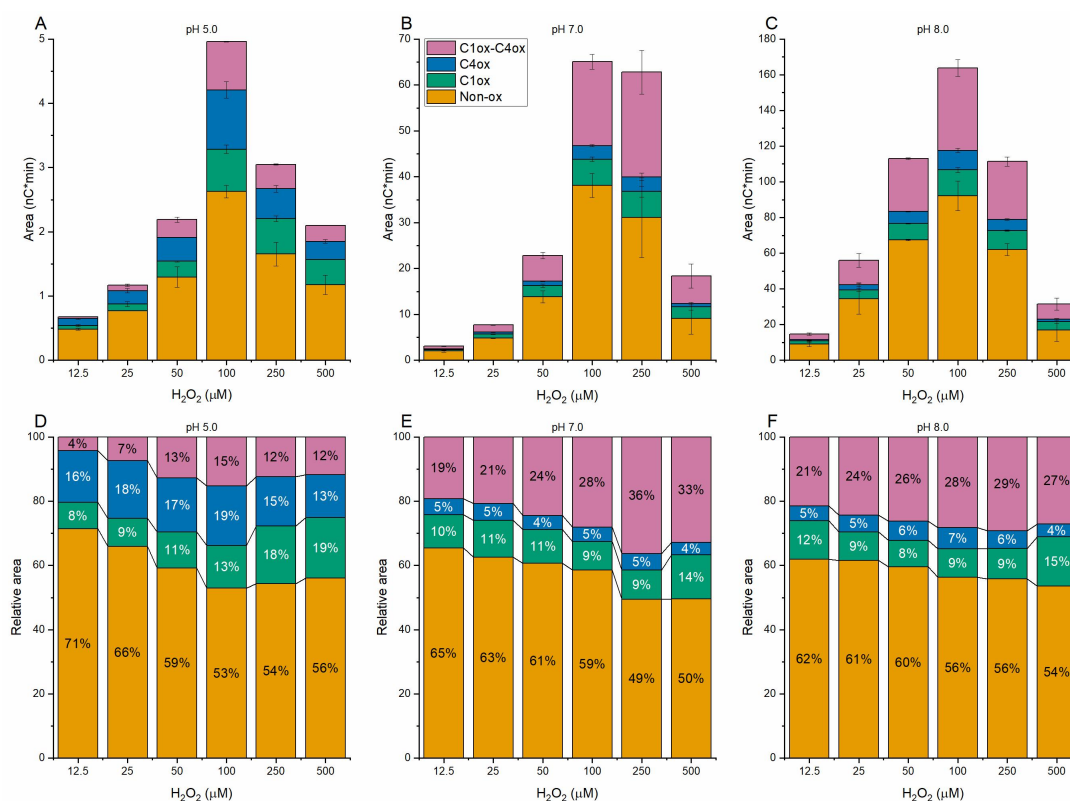


Figura 38 - Resposta de TtLPMO9H a variação da concentração de  $H_2O_2$  adicionado. De A-C, estão representadas as áreas totais, empilhadas por tipo, enquanto de D-E, as áreas relativas. A e D se referem a reações em tampão de pH 5.0, B e E em pH 7.0, e C e F em pH 8.0. A legenda é a mesma nos seis painéis. Atenção a diferença de escalas entre os gráficos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para investigar se o peróxido de hidrogênio poderia estar de fato reduzindo diretamente TtLPMO9H, o estado redox da enzima foi avaliado por fluorescência intrínseca

dos aminoácidos aromáticos presentes.<sup>88</sup> TtLPMO9H possui muitos aminoácidos aromáticos, dentre os quais estão uma tirosina catalítica, e triptofanos na proximidade. A redução do cobre provavelmente resulta em alterações no ambiente eletrônico que são refletidas na alteração da fluorescência. Foram obtidos os espectros de TtLPMO9H oxidada, e com redução com ácido gálico como controle. De fato, com ácido gálico a fluorescência aumentou, ao contrário do observado após adição de  $H_2O_2$ , indicando que esse último não reduziu TtLPMO9H diretamente (Figura 39).

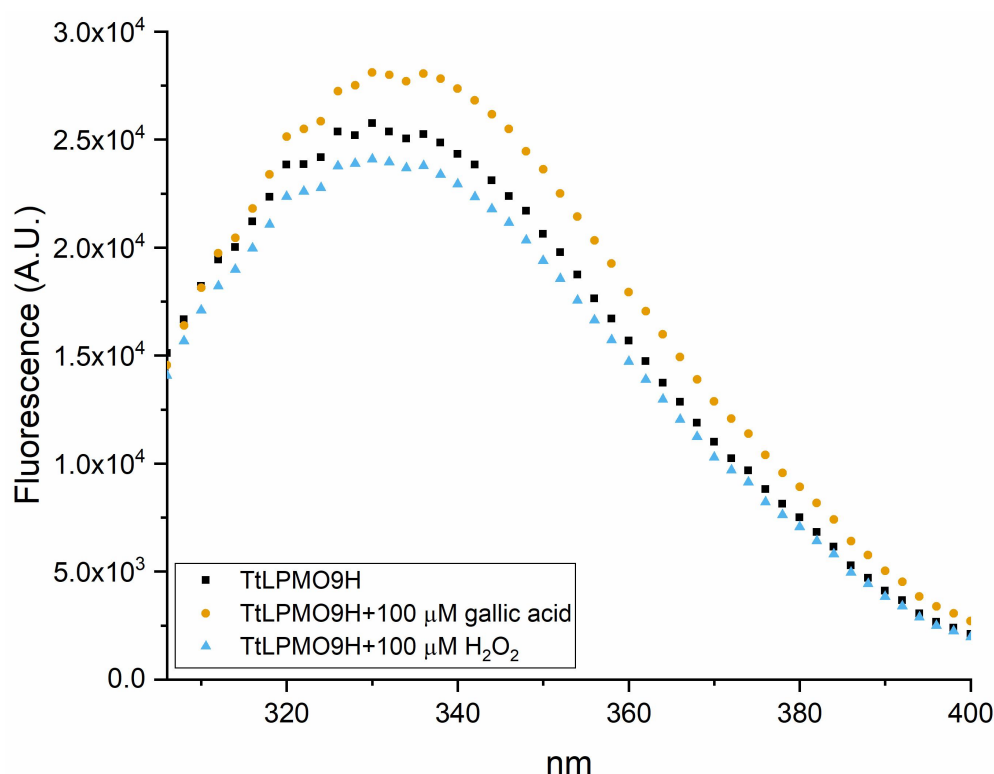


Figura 39 - Estado redox de TtLPMO9H com  $H_2O_2$ . TtLPMO9H teve aumento da fluorescência intrínseca após redução com ácido gálico (linha amarela). Isso não foi observado com a adição de  $H_2O_2$ , indicando que nesta condição TtLPMO9H não foi reduzida. As curvas são a média de triplicatas de cada condição.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5.4 DISCUSSÃO

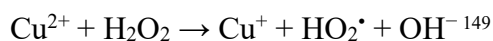
Há alguns anos foi demonstrado que LPMOs podiam ter atividade peroxigenásica. De acordo com o que é atualmente aceito, a LPMO-Cu(II) é primeiro reduzida (ácido ascórbico, gálico etc) a LPMO-Cu(I), e com  $H_2O_2$  como co-substrato, oxida seu substrato. Os resultados aqui apresentados mostraram que na ausência de adição de um agente redutor,  $H_2O_2$  foi suficiente para a ativação de TtLPMO9H, e em menor grau, para a de MtLPMO9A.



Os resultados obtidos são interessantes pois, de meu conhecimento, tais resultados não foram previamente reportados.

Contudo, a identidade do agente redutor das LPMOs continua desconhecida. No entanto, pode-se especular que o próprio  $\text{H}_2\text{O}_2$  age como redutor.<sup>149</sup> Tal evento já foi observado, por exemplo, com Cu-Zn superóxido dismutase, outra metaloenzima que possui um cobre em seu centro catalítico (e que também é vítima de danos oxidativos aos aminoácidos que coordenam o cobre).<sup>150, 151</sup> Assim reduzida, e com  $\text{H}_2\text{O}_2$  como co-substrato, TtLPMO9H poderia oxidar celulose, e liberar produtos.

Outra possibilidade é que as LPMOs foram reduzidas por alguma das espécies reativas resultantes de reação entre cobre e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em reações tipo Fenton:



Em solução aquosa  $\text{HO}_2^\bullet$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  estão em equilíbrio. Sabe-se ainda que  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , é redutora de LPMO.<sup>36, 91</sup> O lado negativo da formação dessas espécies reativas de oxigênio é a oxidação da LPMO, particularmente dos aminoácidos que coordenam o íon cobre.<sup>36</sup> O cobre pode também ser perdido pela enzima danificada, o que intensifica reações entre este íon e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Peróxido de hidrogênio pode ainda atuar na re-oxidação de LPMO- $\text{Cu}^+$ , em reação mais rápida do que re-oxidação por  $\text{O}_2$ .<sup>63</sup> O efeito de pHs alcalinos foi previamente explorado e de maneira geral aumento de pH está relacionado a maior poder de redução. Além disso, foi mostrado que aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  acumulado por LPMO (na reação fútil, sem substrato) tem relação com aumento do pH.<sup>152</sup>

A diferença de resposta das LPMOs à adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ +ácido gálico pode ser atribuída, em parte, à afinidade das enzimas pelo substrato. Enquanto TtLPMO9H possui CBM1, MtLPMO9A é unimodular. A presença do CBM resulta em maior afinidade pelo substrato.<sup>34</sup> Por sua vez, a ligação da enzima ao substrato tem diversas consequências. Uma delas é que LPMOs ligadas aos substratos são menos suscetíveis à inativação oxidativa desencadeada por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>36</sup> A outra consequência é que maior contato com o substrato provavelmente resulta em aumento de produtos,<sup>143</sup> e a reatividade com  $\text{H}_2\text{O}_2$  também aumenta.<sup>63</sup> Quando esses dois pontos são considerados, MtLPMO9A está em desvantagem em ambos. Por outro lado, ácido gálico é um conhecido agente redutor de LPMOs, e a redução de LPMO de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  aumenta a afinidade desta enzima pelo substrato,<sup>75</sup> o que explicaria o aumento de atividade das duas LPMOs na presença deste agente.

Por fim, a proporção de produtos com oxidação no carbono C4 em pH 5.0 em relação aos outros dois pHs avaliados pode ser resultado de alteração de régio-seletividade da

LPMO, tendo sido previamente relatado alteração da coordenação do cobre em pHs ácidos.<sup>73</sup> Uma explicação alternativa é a instabilidade de oxidações em C4 em condições alcalinas.<sup>135</sup>

Em conclusão, foi mostrado que em determinadas condições, peróxido de hidrogênio é o suficiente para a formação de produtos oxidados, mas a LPMO pode ainda se beneficiar da presença de agente redutor como ácido gálico.

## 6 CONCLUSÃO

---

Na primeira parte, a enzima recombinante TtLPMO9H foi caracterizada. A análise por SAXS permitiram confirmar a bimodularidade desta LPMO, que tem seus domínios catalítico e de ligação ao substrato bem separados, e extensa região de linker glicosilada. TtLPMO9H mostrou ser ativa em celulose e hemicelulose, ser termoestável, e ativa em amplo pH. A identificação dos produtos mostrou que TtLPMO9H tem atividade tanto no carbono C1 quanto no carbono C4. Esta LPMO produz maior proporção de produtos não oxidados, o que pode ser característica interessante na aplicação com enzimas hidrolíticas.

TtLPMO9H foi ativada por diferentes sistemas, incluindo por pequenas moléculas, por sistema com pigmento e luz, e por três enzimas diferentes, duas das quais nunca tinham ativado uma LPMO. Essa descoberta permite considerar para a ativação de LPMO enzimas que até o momento possuíam somente papel na degradação da lignina. A efetividade de cada sistema na ativação de LPMO foi modulada por diversos fatores, incluindo pH, concentração, geração de  $H_2O_2$  e tempo de reação. Para futuras aplicações, considerações devem ser feitas na escolha do sistema de ativação adequado.

A LPMO estudada mostrou ter diferentes atividades, incluindo de mono-oxigenase, peroxidase, peroxigenase e oxidase, evidente pelas diferentes formas de medição de atividade. No entanto, não foi objetivo de estudo qual seria a real atividade de TtLPMO9H (se sequer existe), mas é de interesse explorar como a enzima se comporta nos diferentes tipos de reação que pode participar.

Mais curiosamente, TtLPMO9H apresentou atividade na presença somente de  $H_2O_2$ , fato curioso e até o momento não relatado. Apesar dos resultados sugerirem que não há redução por  $H_2O_2$ , a identidade do redutor não foi descoberta. O fato de a outra LPMO avaliada não ter sido ativada tão efetivamente quanto TtLPMO9H levanta questionamentos a respeito de possíveis explicações estruturais para a diferença observada, além da presença de CBM.

Juntos, os resultados mostram as características e funcionamento de uma LPMO da família AA9. Apesar dos avanços e rápido acúmulo de informações a respeito de LPMOs na última década, ainda existem grandes lacunas, que incluem o mecanismo catalítico, quais os intermediários, quais os determinantes estruturais de especificidade, régio-seletividade,

preferência de  $O_2$  ou  $H_2O_2$ , os papéis dessas enzimas in vivo, entre outras. Mesmo as melhores maneiras de lidar com a proteína em laboratório para estudo são temas em constante construção. Portanto, é esperado que LPMOs continuem a ser tópico de interesse por mais tempo.

## REFERÊNCIAS

---

- 1 CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals, *Energy Conversion and Management*, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.
- 2 LANGE, J.P. Lignocellulose conversion: An introduction to chemistry, process and economics, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 1, n. 1, p. 39–48, 2007.
- 3 GODIN, B. *et al.* Chemical characteristics and biofuel potential of several vegetal biomasses grown under a wide range of environmental conditions, *Industrial Crops and Products*, v. 48, p. 1–12, 2013.
- 4 RAGAUSKAS, A. J. *et al.* Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery, *Science*, v. 344, p. 1–10, 2014.
- 5 LIAO, J. J. *et al.* Current advancement on the isolation, characterization and application of lignin, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 162, p. 985–1024, 2020.
- 6 PAYNE, C. M. *et al.* Fungal cellulases, *Chemical Reviews*, v. 115, p. 1308–1448, 2015.
- 7 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.
- 8 VAAJE-KOLSTAD, G. *et al.* An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides, *Science*, v. 330, p. 219–222, 2010.
- 9 VAAJE-KOLSTAD, G. *et al.* The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation, *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 31, p. 28492–28497, 2005.
- 10 LEVASSEUR, A. *et al.* Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes, *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 41, 2013.
- 11 REESE, E. T.; SIU, R. G. H; 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.
- 12 ERIKSSON, K.-E; PETTERSSON, B.; WESTERMARK, U. Oxidation: An important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose, *FEBS Letters*, v. 49, n. 2, p. 282–285, 1974.
- 13 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, p. 144–154, 2008.

- 14 VAAJE-KOLSTAD, G. *et al.* Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21, *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 12, p. 11313–11319, 2005.
- 15 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 of the United States of America*, v. 108, n. 37, p. 15079–15084, 2011.
- 16 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. 12, p. 1399–1406, 2011.
- 17 AACHMANN, F. L. *et al.* NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 46, p. 18779–18784, 2012.
- 18 FORSBERG, Z. *et al.* Cleavage of cellulose by a CBM33 protein, *Protein Science*, v. 20, n. 9, p. 1479–1483, 2011.
- 19 BEESON, W. T. *et al.* Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases, *Journal of the American Chemical Society*, v. 134, p. 890–892, 2012.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 VU, V. V. *et al.* A family of starch-active polysaccharide monooxygenases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 38, p. 13822–13827, 2014.
- 23 COUTURIER, M. *et al.* Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation, *Nature Chemical Biology*, v. 14, p. 306–310, 2018.
- 24 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.
- 25 FILIATRAULT-CHASTEL, C. *et al.* AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes, *Biotechnology for Biofuels*, v. 12, n. 55, p. 1–15, 2019.
- 26 SABBADIN, F. *et al.* Secreted pectin monooxygenases drive plant infection by pathogenic oomycetes, *Science*, v. 373, p. 1–6, 2021.

27 DRULA, E. *et al.* The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature, *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D571–D577, 2022.

28 PETROVIC, D. M. *et al.* Methylation of the N-terminal histidine protects a lytic polysaccharide monooxygenase from auto-oxidative inactivation, *Protein Science*, v. 27, p. 1636–1650, 2018.

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

30 FRANDBSEN, K. E. H.; LO LEGGIO, L. Lytic polysaccharide monooxygenases: A crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes, *IUCrJ*, v. 3, pt. 6, p. 448–467, 2016.

31 FRANDBSEN, K. E. H. *et al.* Identification of the molecular determinants driving the substrate specificity of fungal lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs), *Journal of Biological Chemistry*, v. 296, p. 1–11, 2021.

32 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.

33 BORISOVA, A. S. *et al.* Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity, *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 38, p. 22955–22969, 2015.

34 CHALAK, A. *et al.* Influence of the carbohydrate-binding module on the activity of a fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenase on cellulosic substrates, *Biotechnology for Biofuels*, v. 12, n. 206, p. 1–10, 2019.

35 COURTADE, G. *et al.* The carbohydrate-binding module and linker of a modular lytic polysaccharide monooxygenase promote localized cellulose oxidation, *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 34, p. 13006–13015, 2018.

36 BISSARO, B. *et al.* Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Nature Chemical Biology*, v. 13, p. 1123–1128, 2017.

37 MUTAHIR, Z. *et al.* Characterization and synergistic action of a tetra-modular lytic polysaccharide monooxygenase from *Bacillus cereus*, *FEBS Letters*, v. 592, n. 15, p. 2562–2571, 2018.

38 FORSBERG, Z. *et al.* Structural and functional analysis of a lytic polysaccharide monooxygenase important for efficient utilization of chitin in *Cellvibrio japonicus*, *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 14, p. 7300–7312, 2016.

- 39 AMORE, A. *et al.* Distinct roles of N- and O-glycans in cellulase activity and stability, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 52, p. 13667–13672, 2017.
- 40 PAYNE, C. M. *et al.* Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose-degrading enzymes dynamically bind to cellulose, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 36, p. 14646–14651, 2013.
- 41 HANSSON, H. *et al.* High-resolution structure of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Hypocrea jecorina* reveals a predicted linker as an integral part of the catalytic domain, *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 46, p. 19099–19109, 2017.
- 42 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.
- 43 LI, X. *et al.* Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases, *Structure*, v. 20, n. 6, p. 1051–1061, 2012.
- 44 ISAKSEN, T. *et al.* A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides, *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 5, p. 2632–2642, 2014.
- 45 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 of the United States of America*, v. 111, n. 17, p. 6287–6292, 2014.
- 46 JAGADEESWARAN, G.; GAINEY, L.; MORT, A. J. An AA9-LPMO containing a CBM1 domain in *Aspergillus nidulans* is active on cellulose and cleaves cello-oligosaccharides, *AMB Express*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- 47 NEKIUNAITE, L. *et al.* FgLPMO9A from *Fusarium graminearum* cleaves xyloglucan independently of the backbone substitution pattern, *FEBS Letters*, v. 590, n.19, p. 3346–3356, 2016.
- 48 LADEVÈZE, S. *et al.* The yeast *Geotrichum candidum* encodes functional lytic polysaccharide monooxygenases, *Biotechnology for Biofuels*, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017.
- 49 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. 186, p. 1–17, 2016.
- 50 FROMMHAGEN, M. *et al.* Distinct substrate specificities and electron-donating systems of fungal lytic polysaccharide monooxygenases, *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1–22, 2018.



- 51 HÜTTNER, S. *et al.* Specific xylan activity revealed for AA9 lytic polysaccharide monooxygenases of the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea* by functional characterization, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 23, p. 1–13, 2019.
- 52 FROMMHAGEN, M. *et al.* Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase, *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, n. 101, p. 1–12, 2015.
- 53 JENSEN, M. S. *et al.* Engineering chitinolytic activity into a cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase provides insights into substrate specificity, *Journal of Biological Chemistry*, v. 294, n. 50, p. 19349–19364, 2019.
- 54 SUN, P. *et al.* Oxidized product profiles of AA9 lytic polysaccharide monooxygenases depend on the type of cellulose, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v.9, n.42, p.14124-14133, 2021.
- 55 ZHOU, X.; ZHU, H. Current understanding of substrate specificity and regioselectivity of LPMOs, *Bioresources and Bioprocessing*, v. 7, n. 11, p. 1–19, 2020.
- 56 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, 2014.
- 57 FORSBERG, Z. *et al.* Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monooxygenase functionality, *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 4, p. 1397–1412, 2018.
- 58 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 of the United States of America*, v. 108, n. 37, p. 15079-15084, 2011.
- 59 BEY, M. *et al.* Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (Family GH61) from *Podospora anserina*, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 2, p. 488–496, 2013.
- 60 CHEN, C. *et al.* Regioselectivity of oxidation by a polysaccharide monooxygenase from *Chaetomium thermophilum*, *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, n. 155, p. 1–16, 2018.
- 61 STEPNOV, A. A. *et al.* Unraveling the roles of the reductant and free copper ions in LPMO kinetics, *Biotechnology for Biofuels*, v. 14, n. 28, p. 1–14, 2021.
- 62 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. 1, p. 1–13, 2012.

- 63 BISSARO, B. *et al.* Molecular mechanism of the chitinolytic peroxygenase reaction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 3, p. 1504–1513, 2020.
- 64 KUUSK, S. *et al.* Kinetics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase, *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 2, p. 523–531, 2018.
- 65 RIEDER, L. *et al.* Kinetic characterization of a putatively chitin-active LPMO reveals a preference for soluble substrates and absence of monooxygenase activity, *ACS Catalysis*, v. 11, n. 18, p. 11685–11695, 2021.
- 66 HANGASKY, J. A.; IAVARONE, A. T.; MARLETTA, M. A. Reactivity of O<sub>2</sub> versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with polysaccharide monooxygenases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 19, p. 4915–4920, 2018.
- 67 BRANDER, S. *et al.* Scission of glucosidic bonds by a *Lentinus similis* lytic polysaccharide monooxygenases is strictly dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> while the oxidation of saccharide products depends on O<sub>2</sub>, *ACS Catalysis*, v. 14, p. 13848–13859, 2021.
- 68 MÜLLER, G. *et al.* The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail, *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, n. 209, p. 1–17, 2018.
- 69 WESTERENG, B. *et al.* Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer, *Scientific Reports*, v. 5, p. 1–9, 2015.
- 70 KRACHER, D. *et al.* Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation, *Science*, v. 352, n. 6289, p. 1098–1101, 2016.
- 71 FROMMHAGEN, M. *et al.* Boosting LPMO-driven lignocellulose degradation by polyphenol oxidase-activated lignin building blocks, *Biotechnology for Biofuels*, v. 10, n. 121, p. 1–16, 2017.
- 72 FROMMHAGEN, M. *et al.* Quantification of the catalytic performance of C1-cellulose-specific lytic polysaccharide monooxygenases, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, p. 1281–1295, 2018.
- 73 FRANDSEN, K. E. H. *et al.* Unliganded and substrate bound structures of the celooligosaccharide active lytic polysaccharide monooxygenase LsAA9A at low pH, *Carbohydrate Research*, v. 448, p. 187–190, 2017.
- 74 COURTADE, G. *et al.* Interactions of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase with β-glucan substrates and cellobiose dehydrogenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 21, p. 5922–5927, 2016.

- 75 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.
- 76 HANGASKY, J. A.; MARLETTA, M. A. A random-sequential kinetic mechanism for polysaccharide monooxygenases, *Biochemistry*, v. 57, n. 22, p. 3191–3199, 2018.
- 77 LANGSTON, J. A. *et al.* Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 19, p. 7007–7015, 2011.
- 78 LUDWIG, R. *et al.* Cellobiose dehydrogenase: A versatile catalyst for electrochemical applications, *ChemPhysChem*, v. 11, n. 13, p. 2674–2697, 2010.
- 79 TAN, T. C. *et al.* Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation, *Nature Communications*, v. 6, p. 1–11, 2015.
- 80 FELICE, A. K. G. *et al.* Chimeric cellobiose dehydrogenases reveal the function of cytochrome domain mobility for the electron transfer to lytic polysaccharide monooxygenase, *ACS Catalysis*, v. 11, p. 517–532, 2021.
- 81 KRACHER, D. *et al.* Polysaccharide oxidation by lytic polysaccharide monooxygenase is enhanced by engineered cellobiose dehydrogenase, *FEBS Journal*, v. 287, n. 5, p. 897–908, 2020.
- 82 GARAJOVA, S. *et al.* Single-domain flavoenzymes trigger lytic polysaccharide monooxygenases for oxidative degradation of cellulose, *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–9, 2016.
- 83 VÁRNAI, A. *et al.* The pyrroloquinoline-quinone-dependent pyranose dehydrogenase from *Coprinopsis cinerea* drives lytic polysaccharide monooxygenase action, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84, n. 11, p. 1–14, 2018.
- 84 BRANCH, J. *et al.* C-type cytochrome-initiated reduction of bacterial lytic polysaccharide monooxygenases, *Biochemical Journal*, v. 478, n. 14, p. 2927–2944, 2021.
- 85 MARTÍNEZ, A. T. *et al.* Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations, *Biotechnology Advances*, v. 35, n. 6, p. 815–831, 2017.
- 86 MANAVALAN, T. *et al.* Sugar oxidoreductases and LPMOs – two sides of the same polysaccharide degradation story?, *Carbohydrate Research*, v. 505, p. 1–10, 2021.
- 87 HADDAD MOMENI, M. *et al.* Discovery of fungal oligosaccharide-oxidising flavo-enzymes with previously unknown substrates, redox-activity profiles and interplay with LPMOs, *Nature Communications*, v. 12, p. 1–13, 2021.

- 88 BISSARO, B. *et al.* Fueling biomass-degrading oxidative enzymes by light-driven water oxidation, *Green Chemistry*, v. 18, n. 19, p. 5357–5366, 2016.
- 89 CANNELLA, D. *et al.* Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme, *Nature Communications*, v. 7, p. 1–8, 2016.
- 90 MÖLLERS, K. B. *et al.* On the formation and role of reactive oxygen species in light-driven LPMO oxidation of phosphoric acid swollen cellulose, *Carbohydrate Research*, v. 448, p. 182–186, 2017.
- 91 BISSARO, B. *et al.* Controlled depolymerization of cellulose by light-driven lytic polysaccharide oxygenases, *Nature Communications*, v. 11, n. 890, p. 1–12, 2020.
- 92 LOOSE, J. S. M. *et al.* A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monooxygenase, *FEBS Letters*, v. 588, n. 18, p. 3435–3440, 2014.
- 93 ASKARIAN, F. *et al.* The lytic polysaccharide monooxygenase CbpD promotes *Pseudomonas aeruginosa* virulence in systemic infection, *Nature Communications*, v. 12, p. 1–19, 2021.
- 94 ZARATTINI, M. *et al.* LPMO-oxidized cellulose oligosaccharides evoke immunity in *Arabidopsis* conferring resistance towards necrotrophic fungus *B. cinerea*, *Communications Biology*, v. 4, n. 1, 2021.
- 95 PASPALIARI, D. K. *et al.* *Listeria monocytogenes* has a functional chitinolytic system and an active lytic polysaccharide monooxygenase, *FEBS Journal*, v. 282, n. 5, p. 921–936, 2015.
- 96 JOHANSEN, K. S. Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases, *Biochemical Society Transactions*, v. 44, p. 143–149, 2016.
- 97 CANNELLA, D. *et al.* Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content, *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 26, p. 1–10, 2012.
- 98 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.
- 99 VILLARES, A. *et al.* Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure, *Scientific Reports*, v. 7, p. 1–9, 2017.
- 100 SONG, B. *et al.* Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monooxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility, *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, n. 41, p. 1–11, 2018.

101 KOSKELA, S. *et al.* Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) mediated production of ultra-fine cellulose nanofibres from delignified softwood fibres, *Green Chemistry*, v. 21, n. 21, p. 5924–5933, 2019.

102 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.

103 DAI, L. *et al.* Catalytically inactive lytic polysaccharide monooxygenase PcAA14A enhances the enzyme-mediated hydrolysis of polyethylene terephthalate, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 190, p. 456–462, 2021.

104 WANG, D. *et al.* Production of functionalised chitins assisted by fungal lytic polysaccharide monooxygenase, *Green Chemistry*, v. 20, n. 9, p. 2091–2100, 2018.

105 WESTERENG, B. *et al.* Synthesis of glycoconjugates utilizing the regioselectivity of a lytic polysaccharide monooxygenase, *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 13197, 2020.

106 LI, F. *et al.* Enhanced konjac glucomannan hydrolysis by lytic polysaccharide monooxygenases and generating prebiotic oligosaccharides, *Carbohydrate Polymers*, v. 253, p. 117241, 2021.

107 LI, F. *et al.* Enhanced Fenton reaction for xenobiotic compounds and lignin degradation fueled by quinone redox cycling by lytic polysaccharide monooxygenases, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021.

108 HIGASI, P. M. R. *et al.* Light-stimulated T. thermophilus two-domain LPMO9H: Low-resolution SAXS model and synergy with cellulases, *Carbohydrate Polymers*, v. 260, n. 117814, p. 1–11, 2021.

109 GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (ed.) *The proteomics protocols handbook*. New York: Humana Press, 2005, p. 571–607.

110 BRESLMAYR, E. *et al.* A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase, *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, n. 79, p. 1–13, 2018.

111 WOOD, T. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulose substrates. In: *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1988, v. 160, p. 19–25.

112 KELLER, M. B. *et al.* A simple enzymatic assay for the quantification of C1-specific cellulose oxidation by lytic polysaccharide monooxygenases, *Biotechnology Letters*, v. 42, n. 1, p. 93–102, 2019.

113 HAMMERSLEY, A. P. FIT2D: A multi-purpose data reduction, analysis and visualization program, *Journal of Applied Crystallography*, v. 49, p. 646–652, 2016.

- 114 FRANKE, D. *et al.* ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions, *Journal of Applied Crystallography*, v. 50, n. 4, p. 1212–1225, 2017.
- 115 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *Journal of Applied Crystallography*, v. 25, n. 4, p. 495–503, 1992.
- 116 KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models, *Journal of Applied Crystallography*, v. 34, n. 1, p. 33–41, 2001.
- 117 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering, *Journal of Applied Crystallography*, v. 36, n. 3, p. 860–864, 2003.
- 118 PETOUKHOV, M. V.; SVERGUN, D. I. Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems, *Acta Crystallographica Section D: biological crystallography*, v. 71, p. 1051–1058, 2015.
- 119 PETOUKHOV, M. v. *et al.* New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis, *Journal of Applied Crystallography*, v. 45, n. 2, p. 342–350, 2012.
- 120 TUUKKANEN, A. T.; KLEYWEGT, G. J.; SVERGUN, D. I. Resolution of ab initio shapes determined from small-angle scattering, *IUCrJ*, v. 3, pt. 6, p. 440–447, 2016.
- 121 PIIADOV, V. *et al.* SAXSMoW 2.0: Online calculator of the molecular weight of proteins in dilute solution from experimental SAXS data measured on a relative scale, *Protein Science*, v. 28, n. 2, p. 454–463, 2019.
- 122 TRIA, G. *et al.* Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering, *IUCrJ*, v. 2, pt. 2, p. 207–217, 2015.
- 123 BURGER, V. M.; ARENAS, D. J.; STULTZ, C. M. A structure-free method for quantifying conformational flexibility in proteins, *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2016.
- 124 KRAULIS, P. J. *et al.* Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. a study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing, *Biochemistry*, v. 28, n. 18, p. 7241–7257, 1989.
- 125 ESWAR *et al.* Protein structure modeling with MODELLER. *In*: KOBE, B., GUSS, M., HUBER, T. (eds), *Structural proteomics, methods in molecular biology*. New York: Humana Press, 2008, v. 426, p. 145–159.

126 SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; HAMMEL, M.; SALI, A. FoXS: A web server for rapid computation and fitting of SAXS profiles, *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. 2, p. W540-4, 2010.

127 EIJSINK, V. G. H. *et al.* On the functional characterization of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs), *Biotechnology for Biofuels*, v. 12, n. 58, p. 1–16, 2019.

128 PATEL, A. K. *et al.* Thermostable cellulases: Current status and perspectives, *Bioresource Technology*, v. 279, p. 385–392, 2019.

129 SINGH, R. K. *et al.* Thermal unfolding and refolding of a lytic polysaccharide monoxygenase from *Thermoascus aurantiacus*, *RSC Advances*, v. 9, p. 29734–29742, 2019.

130 SUGIMOTO, H. *et al.* Unfolding of CBP21, a lytic polysaccharide monoxygenase, without dissociation of its copper ion cofactor, *Biopolymers*, v. 111, n. 1, p. 1-7, 2020.

131 TANGHE, M. *et al.* Disulfide bridges as essential elements for the thermostability of lytic polysaccharide monoxygenase LPMO10C from *Streptomyces coelicolor*, *Protein Engineering, Design and Selection*, v. 30, n. 5, p. 401–408, 2017.

132 SEMENOVA, M. V. *et al.* Purification and characterization of two forms of the homologously expressed lytic polysaccharide monoxygenase (PvLPMO9A) from *Penicillium verruculosum*, *Biochimica et Biophysica Acta - proteins and proteomics*, v. 1868, n. 1, p. 1-8, 2020.

133 NEVALAINEN, H.; PETERSON, R. Making recombinant proteins in filamentous fungi-Are we expecting too much?, *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 1–10, 2014.

134 BECKHAM, G. T. *et al.* Harnessing glycosylation to improve cellulase activity, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, n. 3, p. 338–345, 2012.

135 WESTERENG, B. *et al.* Simultaneous analysis of C1 and C4 oxidized oligosaccharides, the products of lytic polysaccharide monoxygenases acting on cellulose, *Journal of Chromatography A*, v. 1445, p. 46–54, 2016.

136 STEPNOV, A. A. *et al.* The impact of reductants on the catalytic efficiency of a lytic polysaccharide monoxygenase and the special role of dehydroascorbic acid, *FEBS Letters*, v.576, n.1, p.53-70, 2022.

137 SUN, P. *et al.* Configuration of active site segments in lytic polysaccharide monoxygenases steers oxidative xyloglucan degradation, *Biotechnology for Biofuels*, v. 13, n. 1, p.1-19, 2020.

138 BLOSSOM, B. M. *et al.* Photobiocatalysis by a lytic polysaccharide monoxygenase using intermittent illumination, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 8, p. 9301–9310, 2020.

- 139 SEPULCHRO, A. G. *et al.* Combining pieces: A thorough analysis of light activation boosting power and co-substrate preferences for the catalytic efficiency of lytic polysaccharide monooxygenase MtLPMO9A, *Biofuel Research Journal*, v. 8, n. 3, p. 1454–1464, 2021.
- 140 KADOWAKI, M. A. S. *et al.* Enzymatic versatility and thermostability of a new aryl-alcohol oxidase from *Thermothelomyces thermophilus* M77, *Biochimica et Biophysica Acta - general subjects*, v. 1864, n. 10, p. 129681, 2020.
- 141 KADOWAKI, M. A. S. *et al.* Characterization of a new glyoxal oxidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M77: Hydrogen peroxide production retained in 5-hydroxymethylfurfural oxidation, *Catalysts*, v. 8, n. 10, p. 1–15, 2018.
- 142 VARELA, E. *et al.* Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: Purification and characterization of the recombinant enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta - protein structure and molecular enzymology*, v. 1546, n. 1, p. 107–113, 2001.
- 143 BENNATI-GRANIER, C. *et al.* Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*, *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, n. 90, p. 1–14, 2015.
- 144 BISSARO, B. *et al.* Oxidoreductases and reactive oxygen species in conversion of lignocellulosic biomass, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 82, n. 4, p. 1–51, 2018.
- 145 JANUSZ, G. *et al.* Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution, *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 6, p. 941–962, 2017.
- 146 JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.
- 147 KRACHER, D.; LUDWIG, R. Cellobiose dehydrogenase: An essential enzyme for lignocellulose degradation in nature – a review, *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, v. 67, n. 3, p. 145–163, 2016.
- 148 DAOU, M.; FAULDS, C. B. Glyoxal oxidases: Their nature and properties, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 1–11, 2017.
- 149 BOKARE, A. D.; CHOI, W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes, *Journal of Hazardous Materials*, v. 275, p. 121–135, 2014.
- 150 HODGSON, E. K.; FRIDOVICH, I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme, *Biochemistry*, v. 14, n. 24, p. 5294–5299, 1975.



151 BRAY, R. C. *et al.* Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide, *Biochemical Journal*, v. 139, p. 43–48, 1974.

152 HEGNAR, O. A. *et al.* pH-dependent relationship between catalytic activity and hydrogen peroxide production shown via characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Gloeophyllum trabeum*, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 5, p. 1–15, 2019.

153 WESTERENG, B. *et al.* Analyzing activities of lytic polysaccharide monooxygenases by liquid chromatography and mass spectrometry. In: ABBOT, D.; LAMMERTS VAN BUEREN, A. (eds.), *Protein-carbohydrates interactions: methods in molecular biology*, New York: Humana Press, 2017, v. 1588, p. 71-92.

154 NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment, *Journal of Molecular Biology*, v. 302, n. 1, p. 205–217, 2000.

155 LEMOINE, F. *et al.* NGPhylogeny.fr: New generation phylogenetic services for non-specialists, *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. W1, p. W260–W265, 2019.

156 LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. W1, p. W293–W296, 2021.



## APÊNDICE A - MÉTODOS PARA MEDIR ATIVIDADE DE LPMOs

---

Ao longo da década desde a descoberta das LPMOs, diferentes formas de medir atividade foram descritas. Esses métodos avaliam diferentes atividades, e refletem características distintas das LPMOs. A seguir estão descritos os métodos usados ao longo deste trabalho.

### Detecção de produtos oxidados

Os produtos oxidados por LPMOs, em substratos celulósicos, podem ser diretamente detectados por (cromatografia de troca aniônica de alta performance com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Os produtos solúveis não oxidados e oxidados são separados utilizando coluna CarboPac PA1 (Thermo Fisher Scientific), e gradientes de NaOH e acetato de sódio.

Os celo-oligossacarídeos eluem na seguinte ordem: os não modificados, seguidos dos que possuem oxidação no carbono C1, seguidos pelos que possuem oxidação no carbono C4, e por último os que possuem oxidações nas duas extremidades.

Padrões não modificados estão disponíveis comercialmente, assim como ácido glucônico. Padrões com oxidações em carbono C1 de maior DP podem ser quimicamente<sup>112</sup> ou enzimaticamente produzidos (usando uma CDH, por exemplo) *in house*. Padrões com oxidações no carbono C4 também não estão disponíveis comercialmente, e a produção *in house* já relatada utilizou uma LPMO específica para C4 e com atividade em celo-oligossacarídeos solúveis.<sup>57</sup>

É importante saber que produtos de oxidação em carbono C4 são instáveis nas condições de cromatografia (pH 12) e sofrem decomposição em coluna.<sup>44, 135</sup> Os oligossacarídeos oxidados decompostos são detectados como não oxidados, e com menor DP. Dependendo do substrato, outro tipo de cromatografia é recomendada.

Outro método de detecção e identificação direta de produtos oxidados por LPMOs é através de espectrometria de massa MALDI-ToF. Nas condições usadas, celo-oligossacarídeos com oxidações em C1 e C4 têm massas distintas: o ácido aldônico (da oxidação em C1) aparece com  $m/z +16$  em relação ao oligossacarídeo nativo, enquanto produto da oxidação em C4 aparece com  $m/z -2$  em relação ao nativo.<sup>153</sup>

## Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Este método se baseia na atividade de oxidase das LPMOs, e foi introduzida por Kittl et al.<sup>62</sup> Resumidamente, quando uma LPMO é reduzida (tipicamente por ácido ascórbico) na presença de O<sub>2</sub> e na ausência de substrato (polissacarídico), ela produz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peróxido de hidrogênio é então detectado (por absorbância ou fluorescência) em reação acoplada, com *horseradish* peroxidase e Amplex Red.

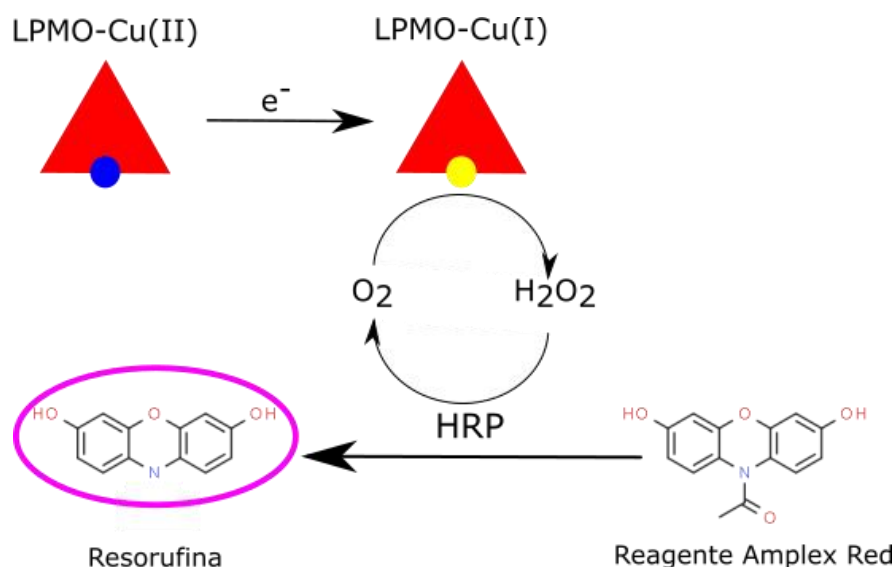


Figura 40 - Quantificação de atividade de LPMO por Amplex Red.

Fonte: Elaborada pela autora.

É um método rápido e que permite *screening* de múltiplas LPMOs e condições ao mesmo tempo. No entanto, interpretação dos resultados deve ser cuidadosa, pois sofre com as múltiplas vias alternativas que ocorrem ao mesmo tempo nas reações com LPMO. É importante ressaltar que certos agentes redutores (como ácido ascórbico) reagem com cobre livre, e resultam na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>136</sup> Outros agentes redutores podem ainda reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido, mascarando o resultado.<sup>152</sup>

## Atividade peroxidásica

Após a publicação que revelou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como co-substrato de LPMOs, um método de detecção de atividade com este substrato foi publicado.<sup>110</sup> De acordo com a metodologia proposta (que não usa substrato polissacarídico), na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LPMO oxida o substrato 2,6-dimetilfenol (2,6-DMP), produzindo radical de 2,6-DMP. Os radicais então se

dimerizam, e o dímero (coerulignona) é detectado espectrofotometricamente pelo aumento de sua absorvância.

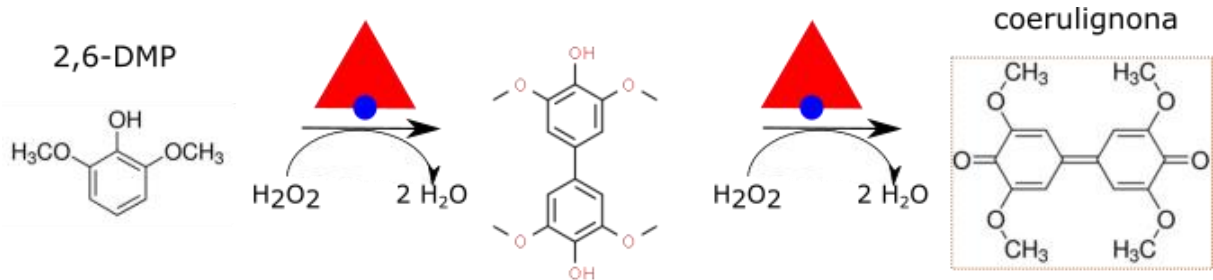


Figura 41 - Atividade de LPMO com 2,6-DMP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Também é possível medir a atividade peroxidásica de LPMOs pela medição da absorvância de ácido ascórbico, que é consumido pela enzima. Também neste método é importante levar em consideração reações independentes de LPMO, entre cobre e ácido ascórbico.



## APÊNDICE B – RESULTADOS COMPLEMENTARES DE CARACTERIZAÇÃO DE TtLPMO9H

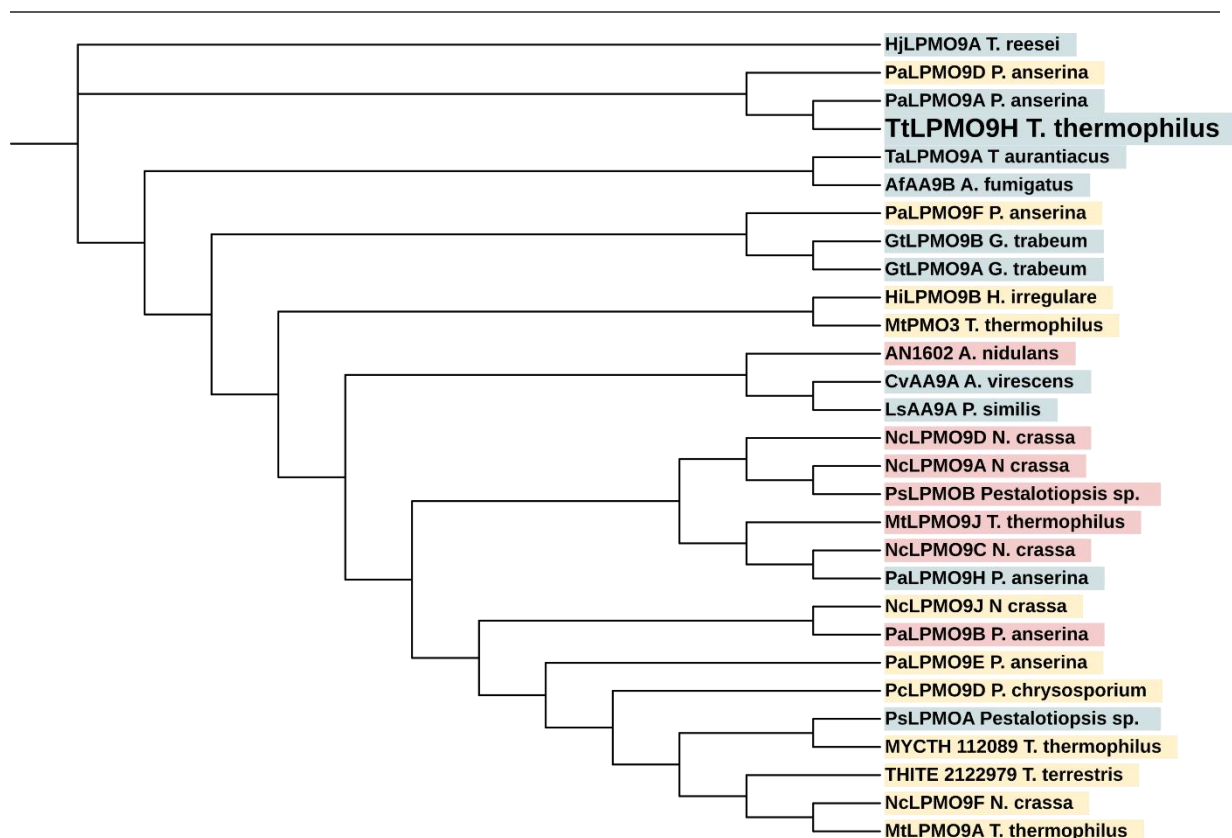


Figura 42 - Dendrograma de TtLPMO9H e AA9s caracterizadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Da página de AA9s do CAZy foram identificadas as enzimas que já foram caracterizadas. As LPMOs com atividade C1/C4 foram destacadas em azul, as de atividade em C1 estão em salmão, enquanto em rosa estão as enzimas de atividade C4. A anotação de atividade utilizou a atividade descrita no CAZy. As exceções foram TaLPMO9A e MtLPMO9A que, por experiência própria, mostraram ter atividade de C1/C4 e C1, respectivamente. As sequências de aminoácidos dessas enzimas foram alinhadas utilizando o servidor online T-Coffee Expresso.<sup>154</sup> A partir do alinhamento a árvore filogenética foi calculada usando o servidor NGPhylogeny.fr<sup>155</sup> em modo default, visualizada e anotada no site em iTOL.<sup>156</sup>

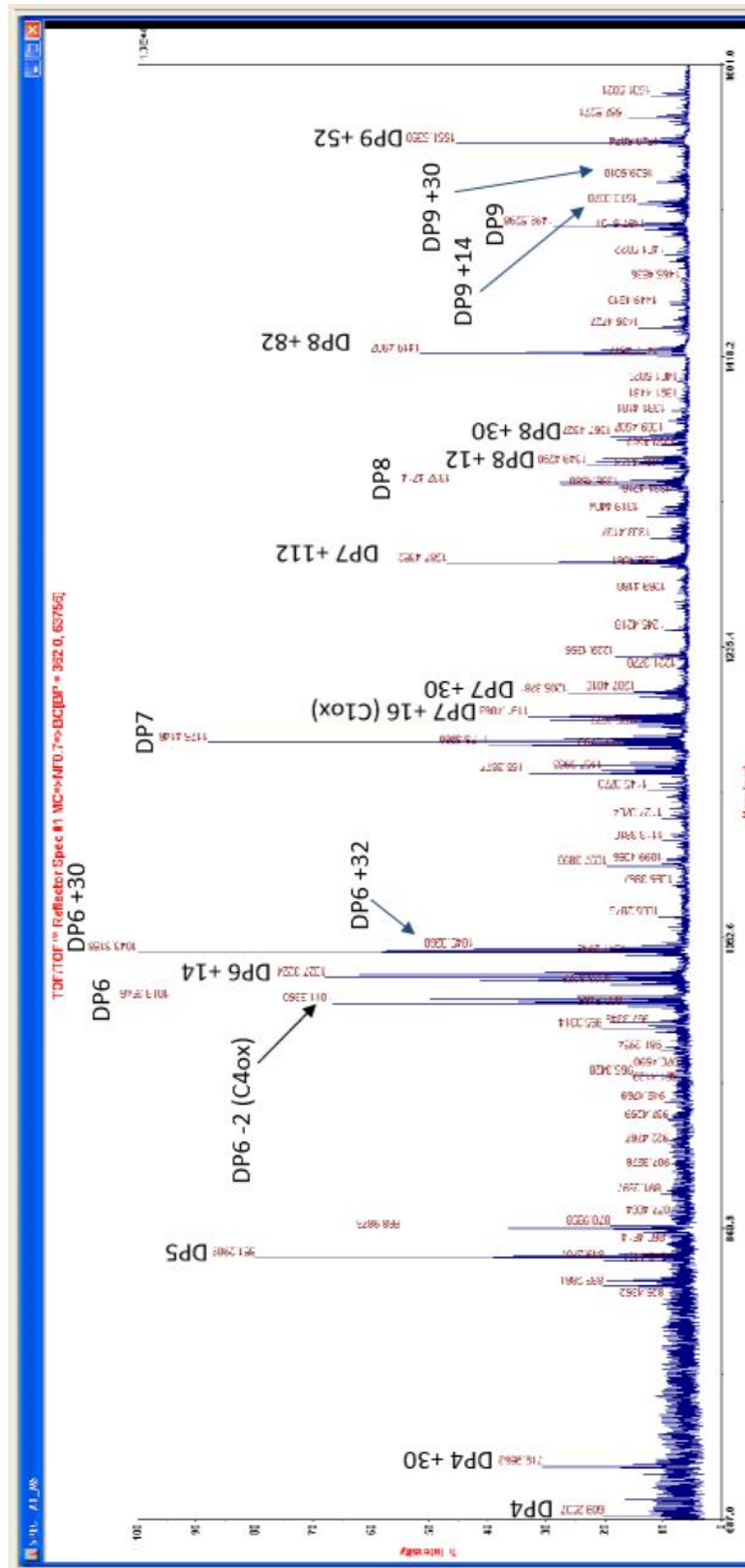


Figura 43 - Espectro MALDI-ToF de produtos de tamanhos entre DP4 e DP9 liberados pela atividade de TtLPMO9H em PASC.

Fonte: Elaborada pela autora.



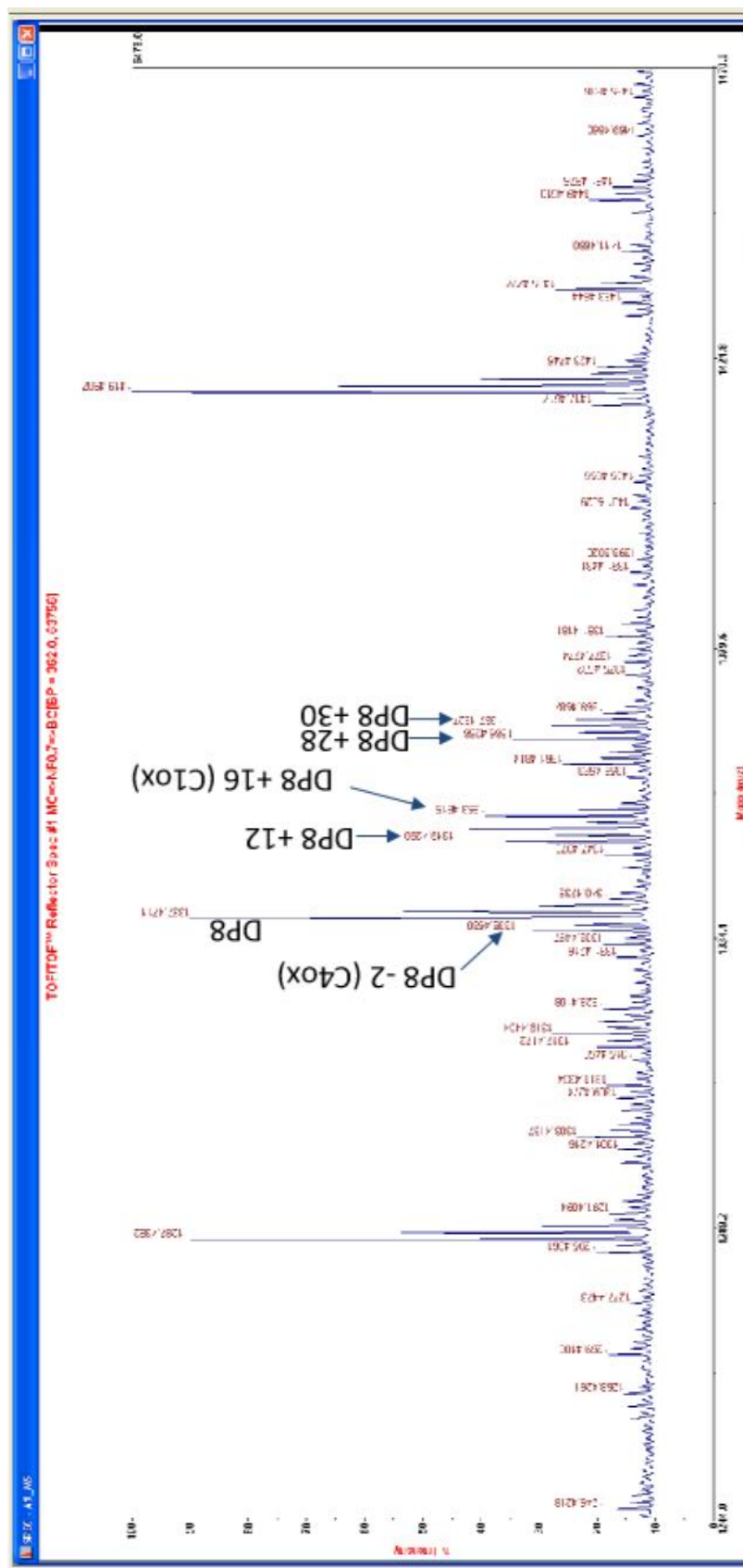


Figura 44 - Detalhe dos produtos de DP8 detectados por MALDI-ToF.

Fonte: Elaborada pela autora.

As anotações nas figuras indicam os produtos identificados, onde DP indica o número de resíduos de glicose. Como pode ser observado, foram detectados produtos de até nove resíduos (Figura 43), e tanto produtos com oxidação em C1 quanto em C4 estavam presentes. A identificação foi feita levando em consideração os adutos de sódio que foram formados. Produtos com carbono C1 oxidado aparecem com diferença de +16 em relação ao oligossacarídeo não modificado (DP, m/z), enquanto oxidações em C4 têm diferença de -2; duplo oxidados aparecem como +14.<sup>153</sup> Foram também detectados produtos com m/z que são múltiplos dos oxidados. De acordo com estudo publicado, esses m/z correspondem a produtos com múltiplas oxidações: em C1 e C6 (+30) e em C1, C4 e C6 (+28);<sup>60</sup> no entanto, oxidações em C6 não são universalmente reconhecidas.

As reações foram de 1  $\mu\text{M}$  de TtLPMO9H em 0.5% PASC, em pH 7.0 por 24 horas.

Os espectros foram obtidos no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, no Departamento de Genética da ESALQ/USP, em colaboração com o Prof. Carlos Labate.

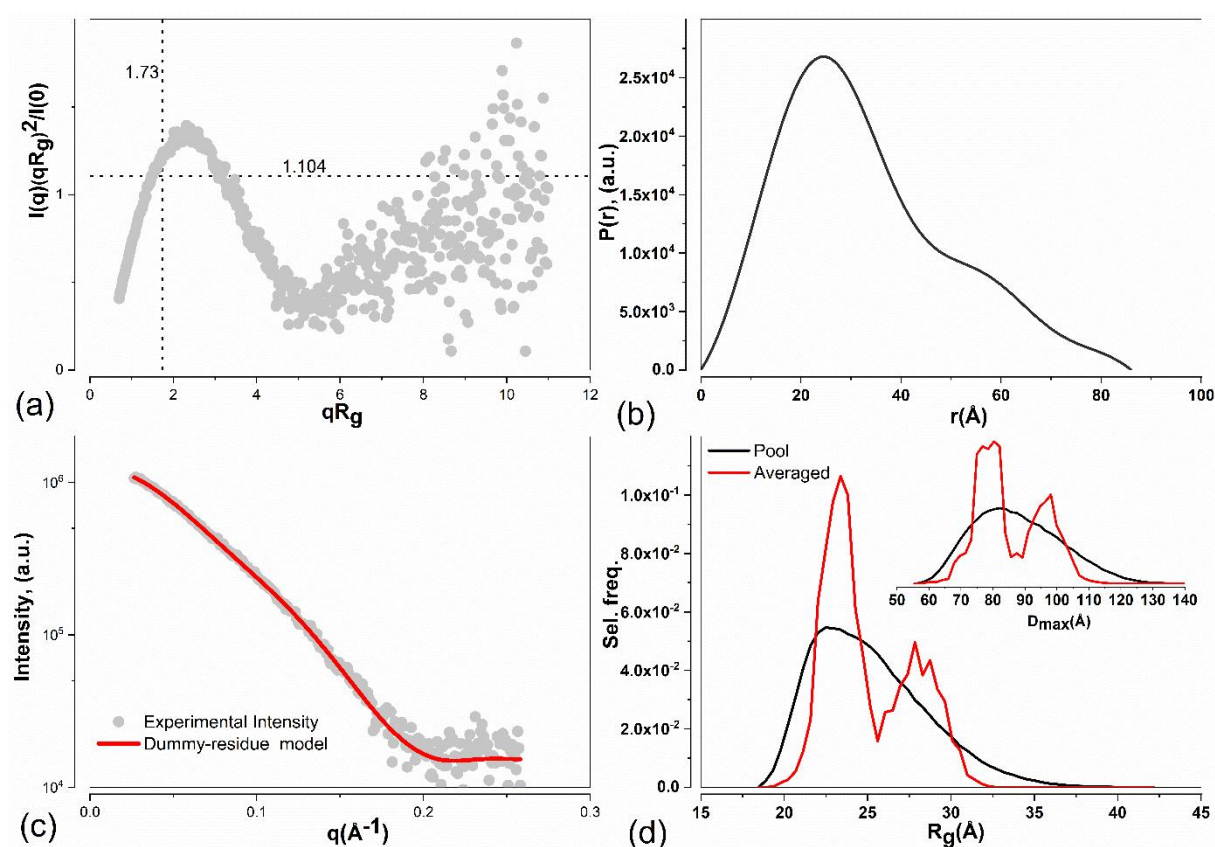


Figura 45 - Processamento e análise dos dados de SAXS. A, gráfico de Kratky foi usado para indicar flexibilidade; B, perfil da função  $P(r)$ . C, comparação entre a medida de SAXS experimental e a calculada a partir do modelo *dummy residue ab initio*. D, caracterização da flexibilidade a partir de  $R_g$  e  $D_{max}$ .

## APÊNDICE C – SÍTIO CATALÍTICO DE TTLPMO9H

---

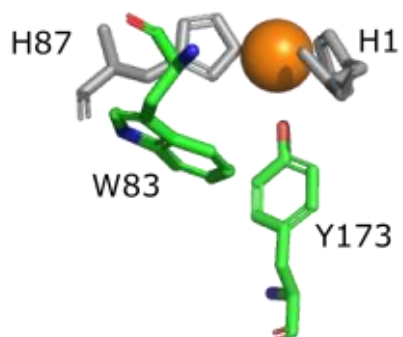


Figura 46 - Aminoácidos aromáticos próximos ao cobre catalítico. A redução do cobre pode alterar o ambiente de tal maneira que a fluorescência intrínseca também é alterada. Em cinza, as histidinas que formam a braçadeira de histidina. Colorido os aminoácidos aromáticos tirosina (que participa da coordenação do cobre) e triptofano.

Fonte: Elaborada pela autora.