

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LUCAS MATEUS SOARES

Clonagem, expressão e purificação de Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs) e
sua aplicação em biorrefinarias

Lorena
2020

LUCAS MATEUS SOARES

Clonagem, expressão e purificação de Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs) e sua aplicação em biorrefinarias

Projeto de trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Químico.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Versão Corrigida

Lorena

2020

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

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

Soares, Lucas Mateus

Clonagem, expressão e purificação de monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e sua aplicação em biorrefinarias / Lucas Mateus Soares; orientador Fernando Segato. – Lorena, 2020. 70 p.

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Química – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Lpmo. 2. Aspergillus niveus. 3. Biorrefinarias. I. Título. II. Segato, Fernando, orient.

RESUMO

SOARES, L. M. **Clonagem, expressão e purificação de Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs) e sua aplicação em biorrefinarias.** 2020. 70 p. Projeto de Monografia (Graduação) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Este estudo visa à clonagem, expressão e purificação de enzimas LPMOs. Genes provenientes do organismo *Aspergillus niveus* foram clonados no vetor pEXPYR, propagados em *Escherichia coli* TOP 10 e transformados em *Aspergillus nidulans* linhagem A773. O estudo tem por objetivo final a expressão das proteínas estudadas e subsequente caracterização bioquímica destas. A aplicação da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) evidenciou a tentativa bem sucedida da amplificação inicial dos genes pretendidos. À semelhança dos genes, também se obteve resultado satisfatório na amplificação do vetor pEXPYR, na montagem de construtores de expressão utilizando o sistema de Clonagem Independente de Ligase (LIC), na transformação em *E. coli*, e, por fim, na transformação em *A. nidulans*. Após inóculo em meio líquido suplementado de maltose 5% por 48 horas e posterior concentração, constatou-se a expressão das LPMOs desejadas. Amostras provenientes de diferentes escalas e cultivos foram concentradas. O cultivo em menor escala forneceu resultados preliminares de atividade em PASC e Avicel®, ao passo que o de maior escala passou por sucessivos métodos de purificação. Os testes de atividade com a enzima purificada, todavia, não foi possível. Somou-se a esse estudo a análise da viabilidade da aplicação das LPMOs em processos de biorrefinarias, bem como suas condições ótimas de atuação em substratos celulósicos e lignocelulósicos, além da discussão acerca dos resultados obtidos em testes laboratoriais à luz da literatura utilizada.

Palavras-chave: LPMO. *Aspergillus niveus*. Biorrefinarias.

ABSTRACT

SOARES, L. M. **Cloning, expression and purification of Lytic Polysaccharide Monooxygenases (LPMOs) and its applications in biorefinery.** 2020. 70 p. Monograph Project (Undergraduate degree) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

This study aims the cloning, the expression and the purification of LPMOs enzymes. Genes from *Aspergillus niveus* were cloned into the vector pEXPYR, propagated in *Escherichia coli* and transformed into *Aspergillus nidulans* strain A773. The study has as target the expression of the studied proteins and subsequent biochemical characterization. The use of electrophoresis in agarose gel 1% (w/v) revealed the successful attempt on the initial amplification of the desired genes. As with the genes, it was also obtained satisfactory results on the amplification of pEXPYR vector, on the expression constructs assemble utilizing the Ligase Independent Cloning (LIC) system, on the transformation into *E. coli* and, finally, into *A. nidulans*. After inoculum in liquid medium supplemented with maltose 5% for 48 hours and subsequent concentration, it was observed the expression of the desired LPMO. Samples from different scales were concentrated. That one performed in small scale provided preliminary results of activity on PASC and Avicel®, while that one performed in large scale passed through successive methods of purification. Activity tests with the purified enzyme, however, were not possible. Added to this study was the analysis of the feasibility of applying LPMOs in biorefineries processes, as well as their optimal performance conditions on cellulosic and lignocellulosic substrates, in addition to the discussion about the results obtained in laboratory tests in the light of the literature used.

Keywords: LPMO. *Aspergillus niveus*. Biorefinery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de degradação da biomassa pela ação de microrganismos.....	15
Figura 2 - Visão geral da celobiose com oxidação em C1 e/ou C4.....	18
Figura 3 - Estrutura típica de uma LPMO	19
Figura 4 - Estrutura típica de uma CBM1.....	19
Figura 5 - Modelo de degradação de celulose para fungos.....	20
Figura 6 - Esquema do protocolo para preparação do vetor de LIC.....	22
Figura 7 - Esquema do protocolo de Clonagem Independente de Ligase (LIC)	23
Figura 8 - Etapas de conversão enzimática em uma biorrefinaria.	24
Figura 9 - Sacarificação do Avicel.	27
Figura 10 - Sacarificação da bétula explodida a vapor.	27
Figura 11 - Aumento de rendimento de sacarificação (%) e liberação de produto oxidado em função do teor de LPMO na mistura.....	28
Figura 12 - Influência de diferentes tipos de pré-tratamento na conversão de glicose.....	29
Figura 13 - Eletroforese em agarose 1% evidenciando a amplificação dos genes.	43
Figura 14 - Gel de eletroforese evidenciando a amplificação dos genes de LPMO clan 5_2. .	44
Figura 15 - Gel de eletroforese evidenciando a amplificação do vetor.	45
Figura 16 - Gel de eletroforese para confirmar a incorporação do inserto pelo vetor	46
Figura 17 - Reação de PCR com as colônias selecionadas.....	47
Figura 18 - PCR de colônia posterior ao Miniprep.....	48
Figura 19 - Representação esquemática da modularidade de LPMO AA9 de <i>A. fumigatus</i>	50
Figura 20 - Gel de SDS-PAGE das amostras concentradas.....	53
Figura 21 - Placas de Petri referentes aos cultivos das amostras 2.3 e 2.5 em meio sólido.	54
Figura 22 - Eletroforese em SDS-PAGE 15% dos extratos 2.3 e 2.5.....	55
Figura 23 - Fluxograma dos componentes da mistura reacional para atividade das enzimas LPMO 3_1 e Celluclast comercial.....	56
Figura 24 - Absorbância das reações com Avicel® pelo método colorimétrico de DNS.	57
Figura 25 - Absorbância das reações com PASC pelo método colorimétrico de DNS.	57
Figura 26 - Eletroforese em SDS-PAGE 15% de cada fração eluída em diferentes concentrações de NaCl e flow through.	59
Figura 27 - Cromatograma relativo à injeção 2 da amostra não concentrada.....	60
Figura 28 - Cromatograma relativo à injeção 3 da amostra concentrada.	61
Figura 29 - Análise do gel pós-purificação que correspondem às injeções 2 e 3.	62
Figura 30 - Cromatograma relativo à injeção 5 contendo as amostras 17.2, 16.3 e 18.3.	63
Figura 31 - Cromatograma relativo à injeção 6 contendo as amostras 17.2, 16.3 e 18.3.	63
Figura 32 - Eletroforese em SDS-PAGE das frações coletadas, correspondente às injeções 5 e 6.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições do termociclador para rotina de PCR.....	32
Tabela 2 - Reagentes e quantidades utilizados na reação de LIC.	34
Tabela 3 - Diluições da solução de NaCl em tampão de fosfato de sódio a 50 mmol/L para purificação por troca iônica.	40
Tabela 4 - Genes estudados e seus respectivos tamanhos, em pb.....	43
Tabela 5 - Proteínas estudadas e seus respectivos pesos moleculares, ponto isoeletrico teórico (pI) e número de aminoácidos (aa).	49
Tabela 6 - Amostras de 2.1 a 4.1.	51
Tabela 7 - Amostras de 4.2 a 4.8.	51
Tabela 8 - Absorbâncias dos extratos concentrados da LPMO clan 3_2 (2).	52
Tabela 9 - Absorbâncias dos extratos concentrados da LPMO clan 4 (4).	52
Tabela 10 - Quantificação do teor de proteínas dos extratos 2.3 e 2.5.	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características de sistemas de expressão baseados em culturas líquidas.	13
Quadro 2 - Cronograma de atividades	41
Quadro 3 - Sequência de primers utilizados na amplificação por PCR.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Contextualização	10
1.2	Justificativa	11
1.3	Objetivo geral.....	11
1.4	Objetivos específicos	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Definições	12
2.1.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	12
2.1.2	Expressão heteróloga	13
2.1.3	Fungos filamentosos como <i>cell factories</i>	14
2.2	Biomassa e microrganismos.....	14
2.3	Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs)	15
2.4	Organismos termofílicos	20
2.5	<i>Ligase Independent Cloning</i> (LIC)	21
2.6	LPMO e sua aplicação em biorrefinarias de etanol	24
2.7	Substratos e condições de otimização de sacarificação	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	Construção e diluição de <i>primers</i>	31
3.1.1	Construção de <i>primers</i>	31
3.1.2	Diluição de <i>primers</i>	31
3.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e purificação dos genes.....	31
3.2.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31
3.2.2	Purificação dos genes amplificados por PCR	32
3.3	Amplificação e purificação do vetor pEXPYR	33
3.4	Reação de <i>Ligase Independent Cloning</i> (LIC).....	33
3.5	Preparação e transformação de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i>	34
3.5.1	Preparação de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i>	34
3.5.2	Transformação por choque térmico de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> ...	35
3.5.3	Armazenamento das colônias transformadas em solução estoque	35
3.6	Inóculo e Mini prep das colônias em solução estoque	35

3.6.1	Inóculo das colônias.....	35
3.6.2	Mini prep (Extração de DNA plasmidial).....	35
3.7	Transformação em <i>A. nidulans</i> linhagem A773.....	36
3.7.1	Inóculo dos esporos em meio sólido.....	36
3.7.2	Inóculo no meio líquido e obtenção de protoplastos	36
3.7.3	Transformação	37
3.8	Inóculo dos transformantes positivos em meio líquido e quantificação das proteínas totais	38
3.9	Diálise e concentrações dos extratos enzimáticos.....	38
3.10	Purificação.....	39
3.10.1	Purificação por troca iônica	39
3.10.2	Purificação por exclusão de tamanho	40
3.11	Aprofundamentos realizados.....	41
3.12	Cronograma das atividades	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Construção de <i>primers</i>	42
4.2	Amplificação dos genes	43
4.3	Amplificação do vetor pEXPYR.....	44
4.4	Gel da reação de Ligase Independent Cloning (LIC).....	46
4.5	Gel do PCR de colônia.....	47
4.6	Quantificação, análise e atividade de enzimas em escala reduzida	48
4.6.1	Representação e análise das enzimas estudadas	48
4.6.2	Quantificação de proteínas totais.....	50
4.6.3	Análise dos extratos enzimáticos em eletroforese SDS-PAGE	52
4.6.4	Atividade enzimática com os substratos Avicel® e PASC	55
4.7	Purificação e análise.....	58
4.7.1	Purificação por troca iônica em coluna de bancada e análise.....	58
4.7.2	Purificação por exclusão de tamanho e análise	59
5	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE A.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

A produção de combustíveis, materiais e produtos químicos de forma sustentável a partir de biomassa vegetal representa um grande esforço de importância global. A diversificação das fontes de energia, a diminuição da emissão de gases poluentes e o apoio ao desenvolvimento do setor agroindustrial apresentam vantagens importantes para a sociedade a longo prazo. A capacidade das biorrefinarias baseadas em biotecnologia de desempenhar um papel significativo, depende de desenvolver maneiras sustentáveis e econômicas de desconstruir os complexos materiais lignocelulósicos, tais como resíduos agrícolas e florestais. A maioria dos projetos atuais de biorrefinarias envolve a obtenção de biocombustíveis avançados, predominantemente etanol, produzido a partir de açúcares liberados da matéria prima por sacarificação enzimática. (EIBINGER et al., 2017).

A biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida como uma potencial fonte sustentável de açúcares mistos que podem ser utilizados em processos para a produção de biocombustíveis e outros materiais. Nos últimos anos, várias tecnologias têm sido desenvolvidas de modo a permitir que esse processo ocorra, de uma maneira economicamente competitiva. Dentre os principais desafios, considera-se a resistência natural da parede celular vegetal aos ataques microbianos e à destruição enzimática como “recalcitrância da biomassa”, sendo esta responsável pelo alto custo de conversão da biomassa (HIMMEL et al., 2007).

A atividade enzimática de LPMOs foi descoberta, inicialmente, em 2010, em uma proteína AA10 (CBP21) atuando sobre quitina, essas enzimas cobre-dependentes realizam a clivagem oxidativa nas ligações glicosídicas β -1,4 em polissacarídeos, utilizando oxigênio molecular como aceptor de elétrons (ISAKSEN et al., 2014). Essas enzimas constituem uma nova classe de enzimas que deverão desempenhar um papel crucial na degradação da biomassa lignocelulósica (FROMMHAGEN et al., 2015). Foi demonstrado também que LPMOs podem atuar sobre a hemicelulose, esta descoberta promove um aumento no escopo de LPMOs e processos oxidativos na degradação da parede celular vegetal e suas aplicações em biorrefinarias (AGGER et al., 2014).

1.2 Justificativa

A mudança do paradigma energético, essencialmente pautado no petróleo e seus derivados, prevista para os próximos anos é um ensejo para os futuros profissionais ligados às áreas tecnológicas, tal como a Engenharia Química, para explorarem os cenários e viabilizarem as mudanças de tais paradigmas. Cabe a esses profissionais a tarefa de expandir a busca para áreas correlatas, como a biotecnologia, e encontrar fontes sustentáveis para proporcionar tais mudanças.

É com base nessa responsabilidade e senso de urgência enquanto futuro engenheiro químico que, atento à velocidade das mudanças e à importância de buscar caminhos mais sustentáveis para o desenvolvimento tecnológico e econômico, continuo a trilhar um caminho iniciado em 2015 em minha Iniciação Científica. O objetivo deste estudo foi viabilizar o entendimento de uma nova classe de enzimas oxidativas, as LPMOs, por meio de sua expressão heteróloga, caracterização bioquímica e aplicação. A adição dessa nova classe de enzimas em coquetéis enzimáticos está ligada a inúmeras aplicações tecnológicas e industriais, dentre a qual se destacam as biorrefinarias, fontes de produção energética e de compostos químicos de maneira mais limpa e sustentável.

1.3 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consiste no estudo e caracterização bioquímica das enzimas oxidativas LPMOs, passíveis de constituir coquetéis enzimáticos que atuarão na degradação da biomassa lignocelulósicas, em especial, o bagaço de cana e na análise de viabilidade aplicada a biorrefinarias.

1.4 Objetivos específicos

- Amplificação e purificação de genes que codificam LPMOs do fungo *A. niveus*;
- Montagem de vetores de transformação com LPMOs utilizando a técnica de LIC;
- Transformação de *A. nidulans* linhagem A773 com os vetores obtidos;
- Seleção de linhagens com melhores expressões das enzimas;
- Expressão heteróloga, purificação e caracterização bioquímica das enzimas das linhagens selecionadas;
- Estudo do comportamento das enzimas LPMOs em diferentes substratos de aplicação industrial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definições

2.1.1 *Aspergillus nidulans*

Segundo estudos de Timberlake (1980), o fungo *A. nidulans* é um organismo útil no estudo da regulação metabólica e do desenvolvimento. Neste organismo, a transformação é realizada pela remoção das hifas em meio osmoticamente estabilizado para formar protoplastos a partir de conídios, seguida da adição de DNA com um gene que confere uma característica selecionável, tratamento com compostos que facilitam a fusão, regeneração e seleção de protoplastos. A maioria das características selecionáveis complementa as deficiências mutacionais (auxotrofias), mas os genes que conferem resistência aos inibidores de crescimento (antibióticos) também podem ser usados. A maioria dos eventos de transformação envolve recombinação do DNA transformante com os cromossomos (OAKLEY, 2013).

A integração heteróloga de sequências transformadoras ocorre com mais frequência do que a integração homóloga em cepas do tipo selvagem. No entanto, a exclusão do gene *nkuA*, que é um componente essencial da via de junção não homóloga, reduz bastante a integração heteróloga e melhora drasticamente o direcionamento gênico. O sequenciamento e anotação do genoma, juntamente com melhorias nos procedimentos de direcionamento de genes, permitem que estes sejam excluídos rapidamente, substituindo o gene alvo por um marcador selecionável. Os promotores dos genes alvo também podem ser facilmente substituídos por promotores reguláveis e os alelos do tipo selvagem podem ser substituídos por alelos mutantes. Um conjunto de vetores que permite a fácil exclusão de quase todos os genes de *A. nidulans* foi construído e está disponível no *Fungal Genetics Stock Center* (OAKLEY, 2013).

A. nidulans tem sido um dos fungos filamentosos mais amplamente utilizados na pesquisa genética básica e continua a ser utilizado como organismo modelo para o estudo de funções celulares eucarióticas comuns (LUBERTOZZI; KEASLING, 2009). Os fungos do gênero *Aspergilli* crescem em uma ampla faixa de temperaturas (10 – 50 ° C), pH (2,0 – 11,0) e concentração de sal (osmolaridade – de água quase pura até 34% de sal) (KIS-PAPO et al., 2003).

2.1.2 Expressão heteróloga

A produção de proteínas em um organismo diferente do original (expressão heteróloga) consiste na introdução de um gene ou parte deste em um organismo hospedeiro que originalmente não possui a característica introduzida. A inserção do gene no hospedeiro heterólogo é realizada por tecnologia de DNA recombinante. O gene pode ser integrado ao DNA do hospedeiro causando expressão permanente, ou não integrada resultando em expressão transitória. A expressão heteróloga pode ser feita em muitos tipos de organismos hospedeiros, que pode ser uma bactéria, levedura, célula de mamífero ou vegetal. Este *host* é chamado de "sistema de expressão" (STEPHANOPOULOS, 2012).

No cenário atual, é comum que uma fábrica celular (*cell factory*) fúngica usada para a expressão de produtos gênicos selecionados seja um mutante secretor de proteínas, para a qual as características foram modificadas pela engenharia genética. Em uma comparação geral com outros sistemas de expressão disponíveis para proteínas heterólogas, aplicados em cultura líquida, os fungos filamentosos apresentam bom desempenho e fornecem uma opção potencial de alto rendimento e relativamente barata (NEVALAINEN; TE'O; BERGQUIST, 2005). O Quadro 1 apresenta as características de sistemas de expressão baseados em cultura líquida usados para a produção de proteínas heterólogas.

Quadro 1 - Características de sistemas de expressão baseados em culturas líquidas.

Característica	<i>E. coli</i>	Fungo filamentoso	Levedura	Células de insetos	Células de mamíferos	Células vegetais
Crescimento celular	Horas a dias	Dias a 1 semana	Dias a 1 semana	Dias a 1 semana	Semanas	Meses
Custo do meio de crescimento	Baixo a médio	Baixo a médio	Baixo a médio	Alto	Alto	Médio a alto
Nível de expressão	Baixo a alto	Baixo a alto	Baixo a alto	Baixo a alto	Baixo a alto	Baixo
Capacidade de secreção	Secreção para periplasma	Secreção para o meio	Secreção para o meio	Secreção para o meio	Secreção para o meio	Secreção para o meio

Fonte: Adaptado de Nevalainen, Te'O e Bergquist (2005).

2.1.3 Fungos filamentosos como *cell factories*

Os fungos filamentosos são capazes de secretar grandes quantidades de proteínas específicas. No entanto, o nível de produção de qualquer proteína de interesse em cepas que ocorrem naturalmente é geralmente muito baixo para exploração comercial. A abordagem genética molecular para a geração de cepas de superprodução de proteínas consiste na triagem e no isolamento de uma cepa hospedeira fúngica que produz a proteína de interesse. Com base na sequência da proteína, o gene que codifica essa proteína pode ser clonado usando abordagens baseadas em PCR, seguidas pela caracterização e expressão de genes em hospedeiros fúngicos apropriados (PUNT et al., 2002).

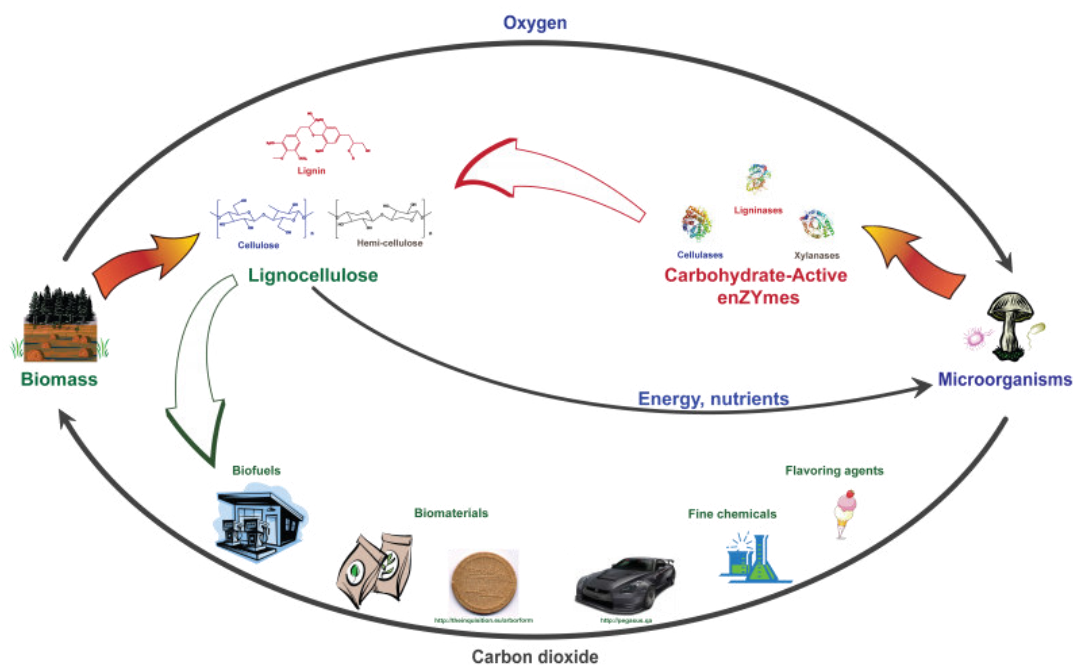
2.2 Biomassa e microrganismos

Em geral, a parede celular vegetal é composta pelas camadas primária e secundária, sendo ambas constituídas a partir de vários polímeros, tais como polissacarídeos, lignina e proteínas. Os polissacarídeos da parede celular vegetal compreendem fibrilas de celulose intercaladas por hemicelulose. A celulose é um polímero linear homogêneo de ligações β -(1 \rightarrow 4) de unidades glicosil e, dependendo da fonte, excede um grau de polimerização de mais de 10.000. Essas microfibrilas são formadas por ligações de hidrogênio e força de van der Waals que compreendem regiões cristalinas e amorfas, que dependem dessas interações. A lignina é um heteropolímero aromático constituído por três monolignóis, e álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico, que apresentam diferentes graus de metoxilação. A rede de lignina na parede celular vegetal é construída de ligações éster e éter com hemicelulose. A hemicelulose é, ao contrário da celulose, um polímero muito heterogêneo (FROMMHAGEN et al., 2015).

Esses polissacarídeos de origem vegetal podem ser convertidos em açúcares simples por meio de organismos que degradam a biomassa tais como bactérias e fungos filamentosos, sendo estes, na natureza, os principais degradadores da biomassa vegetal (FILIATRAULT-CHASTEL et al., 2019). O modelo mais aceito para a despolimerização enzimática da celulose está centrado nas enzimas hidrolíticas classificadas como exoglucanases (ou celobiohidrolases) e endoglucanases (ZHANG; LYND, 2004). As celulasas contêm uma fenda ou um túnel no local ativo, que é revestido com resíduos aromáticos que facilitam a separação da cadeia de glucana da celulose

(TAYLOR et al., 2013). A Figura 1 apresenta o ciclo da degradação da biomassa por microrganismos.

Figura 1 - Ciclo de degradação da biomassa pela ação de microrganismos



Fonte: The British Columbia University (2019).

2.3 Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs)

A degradação enzimática da biomassa vegetal é um dos principais desafios da indústria. Assim, há uma rota contínua para descobrir novos caminhos a fim de promover a degradação de polissacarídeos (QUINLAN et al., 2011). Em um artigo publicado na revista *Science*, Vaaje-Kolstad et al. (2010) descreveram a existência de uma enzima que atuava na superfície da quitina cristalina induzindo à quebra e gerando extremidades na cadeia oxidada, promovendo aumento na degradação pelas quitinases. Ainda neste artigo, foi pontuada que a nova descoberta apresentava fortes indícios acerca de existência de enzimas semelhantes que atuam na cadeia de celulose.

Os indícios apontados por Vaaje-Kolstad et al. em 2010 foram objetos de estudo para artigos posteriores. Em um destes artigos, publicado na *Nature* em 2017, Eibinger et al. (2017) mostraram que as LPMOs representam um paradigma único de degradação da biomassa por um

mecanismo oxidativo. Deste modo, compreender o papel das LPMOs em desconstruir a celulose cristalina é fundamental para a função biológica da enzima, ajudando a especificar o uso de LPMO em aplicações de biorrefinaria.

Em 2015 foi a vez de Beeson et al. (2015) apontarem em um estudo realizado com LPMOs que elas promoviam uma melhora na despolimerização de polissacarídeos recalcitrantes e eram encontradas na maioria dos fungos celulolíticos e bactérias da ordem actinomicetos. As LPMOs apresentam um sítio ativo exposto à superfície com um íon Cu (II) firmemente ligado a dois resíduos de histidina e uma tirosina, que catalisa a hidroxilação regioseletiva da celulose cristalina, levando à clivagem da ligação glicosídica. De acordo com o estudo, alguns fungos celulolíticos contêm mais de 20 genes que codificam LPMOs ativas em celulose. Por essa razão, as LPMOs representam uma grande promessa na redução do custo de conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis.

As LPMOs são classificadas em 4 famílias de atividades auxiliares (AA): AA9 (anteriormente GH61), AA10 (anteriormente CBM33), AA11, e AA13 e compreendem cerca de 300 membros fúngicos amplamente distribuídas nos genomas da maioria dos ascomicetos e basidiomicetos (BENNATI-GRANIER et al., 2015). Talvez, a abordagem mais promissora envolva a aplicação de "fatores de aumento de celulase", tais como glicosil hidrolases (CAZy) família GH61 (QUINLAN et al., 2011). Essas enzimas têm sido identificadas no genoma, transcriptoma e secretoma de diversos fungos e tem sido mostrado um aumento significativo da atividade de celulases. A primeira estrutura tridimensional de uma enzima GH61 revelou uma superfície plana de ligação com o substrato sem resíduo de ácido carboxílico conservado, essencial para a clivagem hidrolítica por celulases (LI et al., 2012). As superfícies "planas" de ligação com substrato dessas enzimas sugerem que elas sejam, de fato, otimizadas pela ligação na superfície de materiais cristalinos, em vez de cadeias individuais de polissacarídeos. No entanto, várias observações indicam que LPMOs podem ter um papel mais amplo na degradação da biomassa (AGGER et al., 2014).

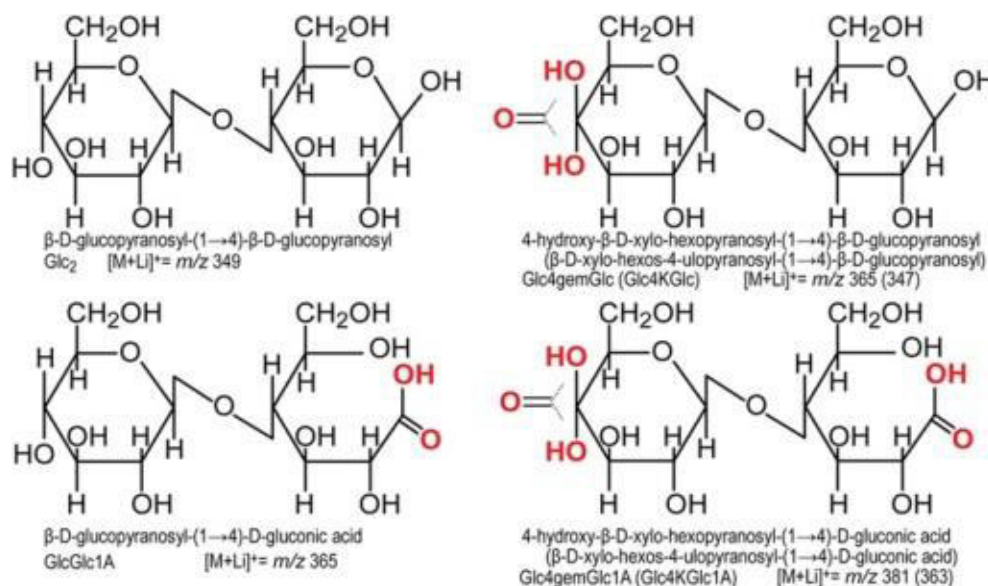
Um grupo de proteínas amplamente expresso no reino dos fungos e utilizado na degradação da biomassa é a família de proteínas Glicosil Hidrolase 61 (GH61). Apesar da extensiva investigação, o mecanismo do aumento da degradação de lignocelulose da GH61 tem permanecido vago. Essas proteínas foram originalmente classificadas como glicosil hidrolases baseado na detecção de baixos níveis de atividade de endoglucanase. No entanto, investigações subsequentes

têm revelado que quando purificada e dentro de claras e definidas condições de ensaio moléculas de GH61 aumentam a degradação de lignocelulose por celulasas e não hidrolisam substratos celulósicos, como celulose microcristalina ou Celulose Entumecida com Ácido Fosfórico (PASC), ou substratos hemicelulósicos, tais como xilana (LANGSTON et al., 2011). A clivagem oxidativa realizada por LPMOs ocorre na presença de pequenas moléculas redox ativas, tais como o ácido ascórbico, glutathione reduzida ou galato. A peculiaridade das LPMOs AA9 fúngicas é sua ação conjunta com a enzima celobiose desidrogenase (CDH), de modo que a associação resulta na clivagem redox mediada da ligação glicosídica em celulose (BENNATI-GRANIER et al., 2015).

Recentemente, mostrou-se que as enzimas LPMOs são enzimas cobre-dependentes que usam redutores equivalentes aos fornecidos pela enzima CDH ou pequenas moléculas redutoras para catalisar a clivagem oxidativa da celulose. Foi proposto um mecanismo de ação para essas enzimas resultando na inserção de oxigênio em celulose nas ligações C-H adjacentes à ligação glicosídica. O produto hidroxilado é instável e se decompõe com a eliminação de uma porção do carboidrato adjacente, causando, assim, a quebra da cadeia de glucana. Desse modo, essas enzimas são monooxigenases de polissacarídeo (PMOs) (LI et al., 2012).

A análise dos produtos da reação de LPMOs mostrou que ela produziu oligômeros oxidados em C1 e C4, e as oxidações são mostradas em vermelho (Figura 2). De acordo com o local preferido de oxidação, foram descritas três classes de AA9 LPMOs, tipo 1 e tipo 2 oxidando C1 e C4, respectivamente, e tipo 3 oxidando tanto C1 quanto C4 na molécula de glicose. A peculiaridade da LPMO AA9 fúngica é sua ação em conjunto com as CDHs, desde sua associação resultando em redox-mediada clivagem da ligação glicosídica em celulose, assumindo um papel chave no sistema oxidativo do fungo (BENNATI-GRANIER et al., 2015).

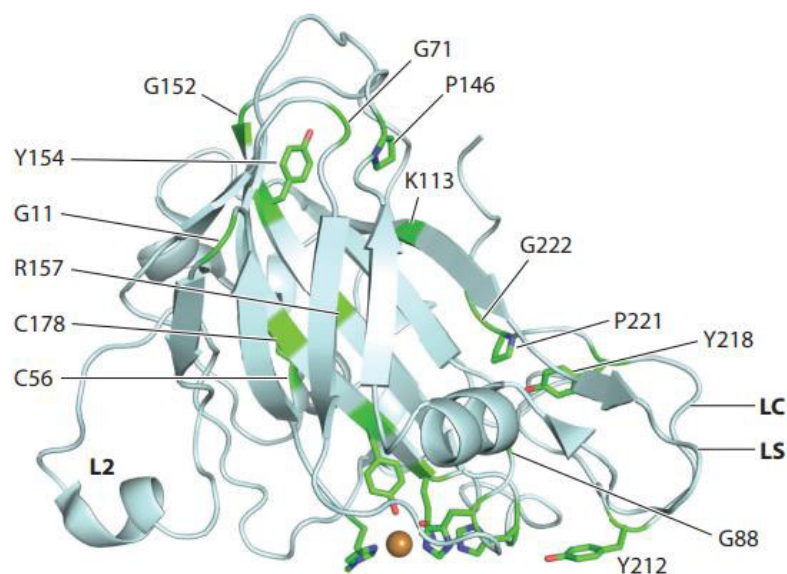
Figura 2 - Visão geral da celobiose com oxidação em C1 e/ou C4.



Fonte: Isaksen et al. (2014).

A conformação geral das LPMOs foi descrita como imunoglobulina ou fibronectina tipo III e consiste em um sanduíche tipo β com tipicamente 8 a 10 folhas β (Figura 3). Uma série de *loops* curtos entre os fios afunilam para uma ponta cônica na extremidade oposta ao sítio ativo; *loops* mais longos frequentemente contêm hélices curtas e formam o plano do sítio ativo. Esses *loops* mais longos variam muito entre as LPMOs; acredita-se que eles funcionem no reconhecimento de substratos e exibam variação em resposta a substratos diversos e às vezes polimórficos (BOOK et al., 2014). O domínio catalítico da LPMO também possui uma superfície putativa para ligação à carboidrato (CBM). Em algumas LPMOs, o domínio catalítico é anexado por meio de uma alça flexível a um módulo de ligação a carboidratos (CBM1 para LPMOs celulolíticas). A estrutura CBM1 (Figura 4) é bem caracterizada e contém três resíduos aromáticos coplanares considerados importantes para a ligação à celulose (KRAULIS et al., 1989). Os membros da família das LPMOs geralmente compartilham baixa identidade de sequência, mas todas as estruturas identificadas até o momento mostram alto grau de similaridade estrutural.

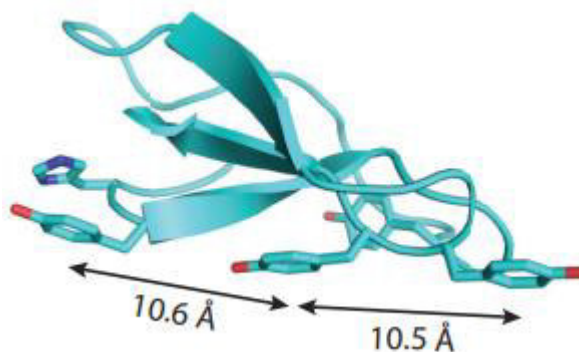
Figura 3 - Estrutura típica de uma LPMO



Fonte: Beeson et al. (2015).

Segundo Floudas et al. (2012), os genes que codificam as LPMOs ativas em celulose são amplamente encontradas, no reino dos fungos, em basidiomicetos e ascomicetos filamentosos, que também estão fortemente correlacionados com a presença de genes que codificam enzimas hidrolíticas.

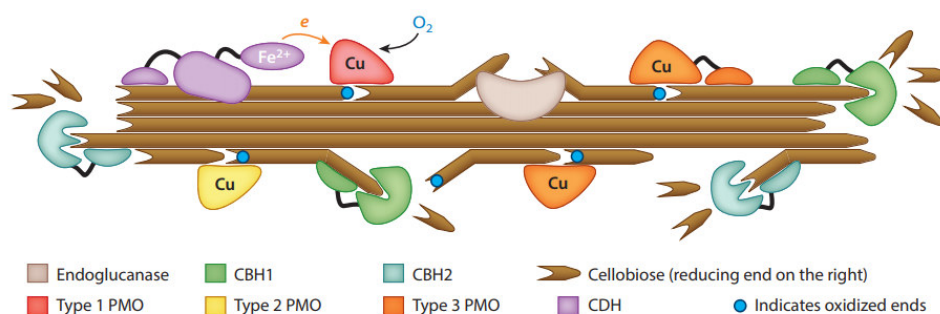
Figura 4 - Estrutura típica de uma CBM1



Fonte: Adptado de Beeson et al. (2015).

A Figura 5 representa o modelo de degradação de celulose para fungos. As exoglucanases atuam nas extremidades das cadeias para gerar açúcares solúveis, que são absorvidos pelo fungo. Endoglucanases e LPMOs aumentam a acessibilidade da celulose às exoglucanases criando novas extremidades de cadeia a partir de regiões internas de cadeias de celuloses amorfa e cristalina, respectivamente. As redutases extracelulares, tais como a CDH, colocalizam-se na superfície da celulose e fornecem os redutores necessários para ativação do oxigênio dependente da LPMO (BEESON et al., 2015).

Figura 5 - Modelo de degradação de celulose para fungos



Fonte: Beeson et al. (2015).

2.4 Organismos termofílicos

Talvez por causa de seu moderado grau de termofilicidade e de seus habitats não exóticos, fungos termofílicos não receberam tanta publicidade e atenção. No entanto, considerando que a grande maioria de eucariotos não conseguem sobreviver à exposição prolongada a temperaturas acima de 40 a 45 °C, a habilidade de algumas espécies de superar as temperaturas limites de eucariotos é um fenômeno que merece elucidação (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000).

Organismos termofílicos podem ser classificados como aqueles organismos que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 45 e 80 °C, hipertermofílicos são aqueles com temperatura ótima de crescimento acima de 80 °C, e mesofílicos são aqueles que apresentam crescimento abaixo de 45 °C. Apenas uma pequena fração estimada em 600.000 fungos é considerada ser termofílica e nenhum fungo tem sido descrito como hipertermofílico (MORGENSTERN et al., 2012).

A preferência de temperatura de fungos termofílicos tem sido definida de diferentes maneiras. De acordo com Cooney e Emerson (1966), o crescimento do fungo com temperatura mínima de 20 °C ou mais e temperatura de crescimento máxima acima de 50 °C são termofílicos, enquanto fungos com crescimento abaixo de 20 até 50 °C são considerados termotolerantes. Eles definem como 40 °C o limite superior de crescimento para organismos (COONEY; EMERSON, 1966). Por outro lado, Maheshwari et al. (2000) propuseram a classificar fungos como termofílicos se suas temperaturas ótimas de crescimento estiverem acima de 40 ou 45 °C, respectivamente (MORGENSTERN et al., 2012).

Fungos termofílicos representam um potencial reservatório de enzimas termoestáveis para aplicações industriais. Eles podem também ser potencialmente desenvolvidos em *cell factories* para auxiliar na produção de produtos químicos e materiais em temperaturas elevadas. As enzimas de fungos termofílicos frequentemente toleram temperaturas mais elevadas do que as enzimas de espécies mesofílicas, e algumas apresentam estabilidade a 70 – 80 °C. Notavelmente, tem sido relatada que a atividade celulolítica de algumas espécies termofílicas foi várias vezes maior que aquela apresentada por espécies mesofílicas (BERKA et al., 2011).

2.5 Ligase Independent Cloning (LIC)

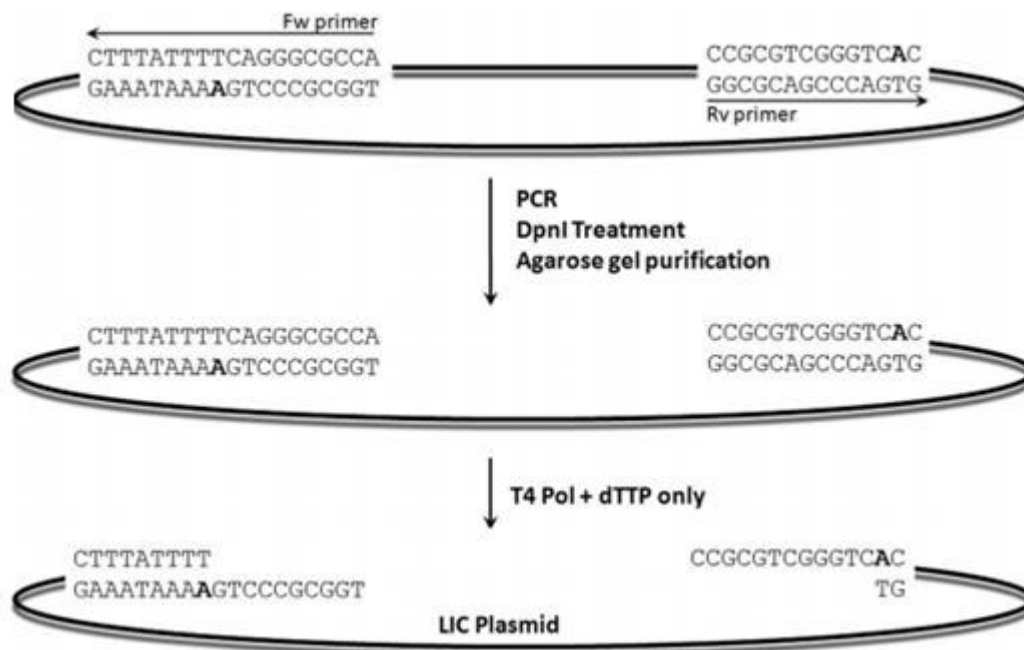
A técnica de Clonagem Independente de Ligase (LIC) é um método simples, rápido e relativamente barato para produção de construtores de expressão. Ela faz uso da atividade exonuclease no sentido 3' → 5' da enzima T4 DNA polimerase para criar regiões bem específicas de 10–15 bases no vetor de expressão. Produtos de PCR com regiões complementares são criados pela construção de extensões apropriadas dentro dos *primers* que são igualmente tratados com T4 DNA polimerase. O anelamento do inserto e do vetor é realizado na ausência de ligase pela simples mistura dos fragmentos de DNA. Tal processo é muito eficiente, pois apenas os produtos desejados podem ser formados (GEERLOF, 2006). O procedimento não requer o uso de enzimas de restrição, T4 DNA ligase ou fosfatase alcalina. As extremidades 5' utilizadas dos *primers* para gerar fragmentos de PCR clonáveis contêm uma sequência adicional de 12 nucleotídeos (nt) sem dCTP. Como resultado, os produtos amplificados incluem uma sequência de 12 nucleotídeos sem dGTP em suas extremidades 3'. A sequência terminal 3' pode ser removida pela ação da atividade (3' → 5') de exonuclease da T4 DNA polimerase na presença de dGTP, levando a fragmentos 5' de cadeia

simples estendidas uma cauda de sequências e comprimentos definidos (ASLANIDIS; DE JONG, 1990).

A circularização do vetor pode ocorrer apenas após a inserção de fragmentos de DNA através de suas extremidades coesivas. O fragmento de vetor anelado de DNA circular é então transformado em *E. coli*, onde os plasmídeos recém-criados serão replicados. Vetores LIC-compatíveis contêm segmentos especificamente designados (LIC sites) nos quais os fragmentos de entrada são clonados (DORTAY et al., 2011).

A preparação do vetor de LIC pela digestão com enzimas de restrição causa decréscimo na eficiência de clonagem e um grande cenário de colônias não recombinantes. A fim de aumentar a eficiência de clonagem eliminando as colônias falso positivos, a estratégia de amplificação do vetor foi usada seguido pelo tratamento por *DpnI* para digerir o molde plasmídico e a purificação do produto pela eletroforese em gel de agarose, como ilustrado na Figura 6 (CAMILO; POLIKARPOV, 2014).

Figura 6 - Esquema do protocolo para preparação do vetor de LIC



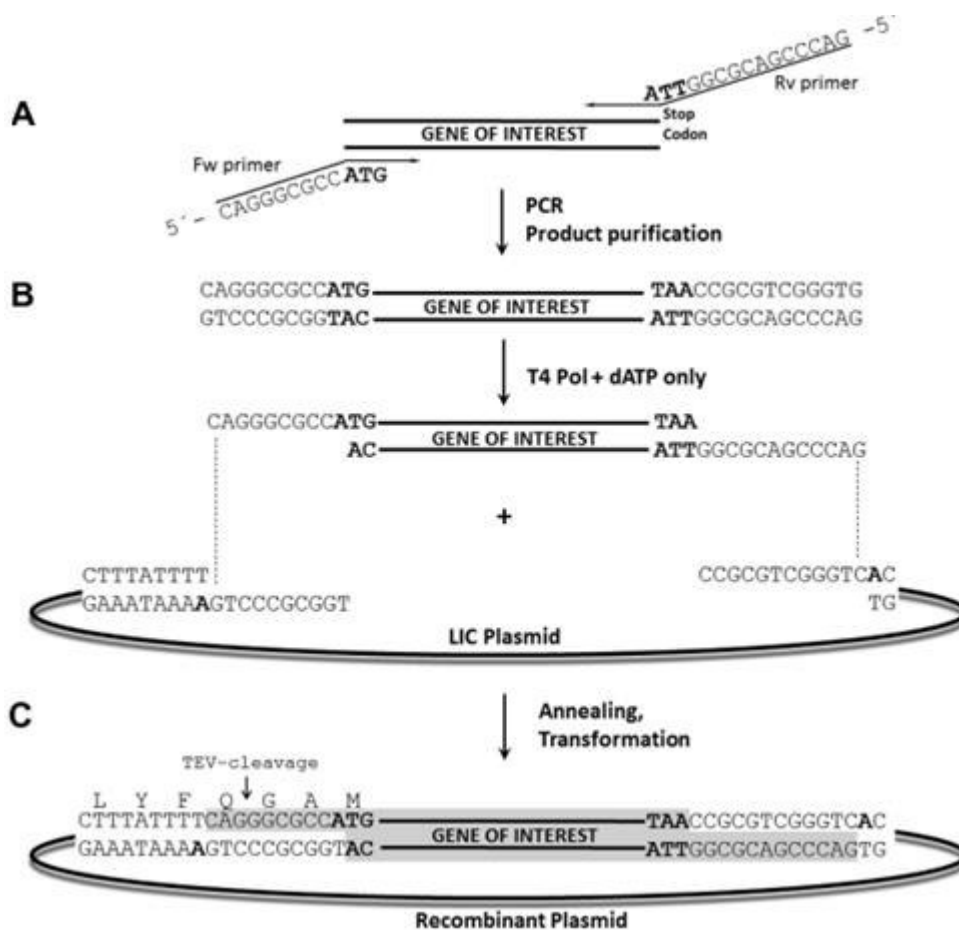
Fonte: Camilo e Polikarpov (2014).

O vetor é linearizado através de amplificação por PCR utilizando *primers* específicos posicionados nas sequências terminais de LIC. Após o tratamento por *DpnI* e purificação por

eletroforese em gel de agarose, o produto é tratado com T4 DNA polimerase e dTTP para formar cadeia simples na extremidade 5' (CAMILO; POLIKARPOV, 2014).

A Figura 7 ilustra a forma como ocorre do LIC, tal que: (A) Os genes são amplificados por PCR utilizando *primers* de genes específicos contendo projeções 5' específicas; (B) Os produtos de PCR são tratados com T4 DNA polimerase e dATP para criar regiões 5' de cadeia simples complementares aos plasmídeos de LIC; (C) Anelamento do inserto e do vetor e transformação em *E. coli* geram plasmídeos recombinantes com fragmento do inserto clonado (CAMILO; POLIKARPOV, 2014).

Figura 7 - Esquema do protocolo de Clonagem Independente de Ligase (LIC)



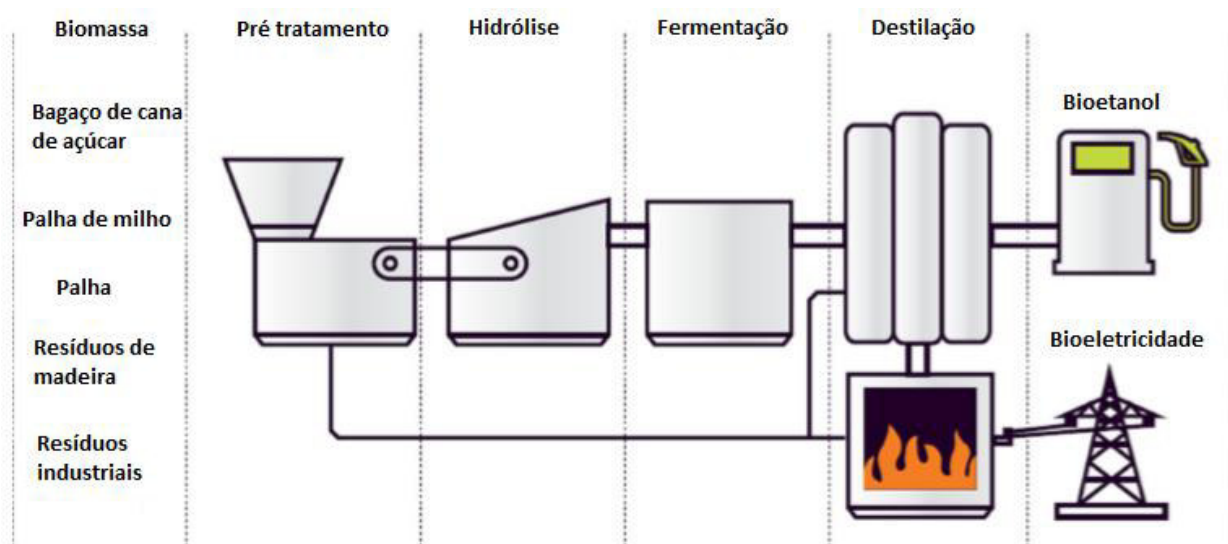
Fonte: Adaptado de Camilo e Polikarpov (2014).

2.6 LPMO e sua aplicação em biorrefinarias de etanol

As LPMOs têm sido propostas para agir sinergicamente com celulasas e quitinases, mostrando promessas de aumentar a atividade dos coquetéis enzimáticos degradantes de biomassa e com um potencial promissor em biorrefinarias (ESCAMILLA-ALVARADO et al., 2017).

A conversão enzimática de materiais lignocelulósicos envolve quatro etapas principais, conforme descrito na Figura 8.

Figura 8 - Etapas de conversão enzimática em uma biorrefinaria.



Fonte: Adaptado de Johansen (2016).

Antes da adição das enzimas, o material vegetal (palha, palha de milho, resíduos de madeira, por exemplo) deve ser pré-tratado. Vários métodos foram desenvolvidos, mas o preferido atualmente é pressionar o cozimento do material com a quantidade de água necessária na forma de vapor. Pequenas quantidades de ácidos são, por vezes, adicionadas para obter uma degradação considerável da hemicelulose da parede celular já neste estágio. Na etapa de hidrólise, o pH e a temperatura são ajustados para níveis compatíveis que as enzimas possam ser usadas (normalmente, pH 5 e 50 °C) e um coquetel enzimático é então adicionado. A mistura é mantida a pH e temperatura constantes por 24–72 horas sob agitação. Uma alta concentração inicial de sólidos (normalmente acima de 20% de matéria seca) deve ser usada para a produção de etanol a partir do

material hemicelulósico para que seja economicamente viável. As reações enzimáticas liquefazem o material durante as primeiras horas por meio do atrito da fibra vegetal. Em um tempo ótimo do processo, a temperatura é reduzida e uma cepa moderna de levedura é adicionada, que converterá a glicose e a xilose liberadas em etanol. Finalmente, o etanol é obtido por destilação e o resíduo de lignina é queimado a fim de gerar o calor e a energia necessários ao funcionamento da planta (JOHANSEN, 2016).

Foi previsto há 60 anos que as enzimas fúngicas desempenhariam um papel essencial na desconstrução da lignocelulose em seus componentes. No entanto, ficou claro que as enzimas celulolíticas fúngicas disponíveis em escala industrial, como o produto enzimático comercial amplamente utilizado Celluclast 1.5L (Novozymes), produzido por uma cepa industrial do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, não eram suficientemente eficientes. Há dez anos, o custo das enzimas era um importante obstáculo para o desenvolvimento de etanol celulósico em escala industrial e, então, diversos fabricantes de enzimas iniciaram programas de pesquisa para reduzir o custo de enzimas requeridas para sacarificação de componentes da parede celular vegetal (JOHANSEN, 2016).

Algumas cepas fúngicas selecionadas por pesquisadores da Novozymes foram testadas para encontrar as melhores enzimas celulolíticas expressas e secretadas por elas. Testaram-se, pela primeira vez, as enzimas secretadas por esses fungos substituindo uma porcentagem da carga de proteína da Celluclast. Nesse ensaio, algumas cepas fúngicas foram identificadas e selecionadas para posterior investigação. Os caldos das cepas fúngicas que melhoraram a eficiência global da sacarificação foram fracionados cromatograficamente, e as frações que continham proteínas individuais foram avaliadas. Constatou-se que estas frações eram ricas em polipeptídeos que poderiam ser classificados como pertencentes à família Glicosil Hidrolase 61 (GH61) (HENRISSAT; DAVIES, 1997).

2.7 Substratos e condições de otimização de sacarificação

Estudos realizados por Harris et al. (2010) e Hu et al. (2014) mostraram que as LPMOs agem sinergicamente com celulasas para melhorar o rendimento da sacarificação e estão presentes nos coquetéis enzimáticos modernos. O papel das LPMOs quando presentes em coquetéis enzimáticos para conversão de biomassa lignocelulósica em alta concentração de matéria seca (MS) foi descrito por Müller et al. (2015). Neste mesmo estudo foram avaliadas as condições de

processo que influenciam na conversão enzimática da biomassa, como acesso a oxigênio e agentes redutores, na eficiência geral da sacarificação e na formação de produtos oxidados, além de diferentes substratos como Avicel (celulósicos) e bétula explodida a vapor (lignocelulósicos).

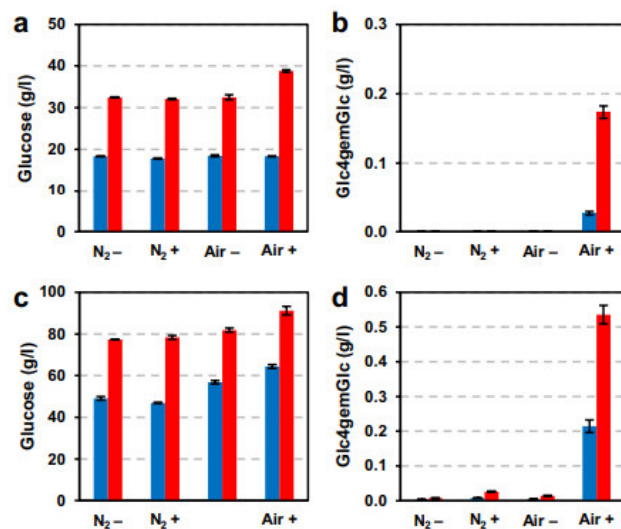
Foi possível quantificar os produtos oxidados em C4 por um novo método, observando a atividade do LPMO diretamente nos processos de degradação, bem como a quantidade relativa de LPMO necessária para otimizar o desempenho do Celluclast 1.5L, um coquetel comercial inicial de celulase contendo pouca atividade de LPMO. Os resultados reforçam a importância das LPMOs nos coquetéis comerciais atuais de celulose e mostram que a sacarificação enzimática eficiente da biomassa lignocelulósica depende do projeto de condições de processamento que promovam a atividade do LPMO (MÜLLER et al., 2015).

A fim de avaliar a sacarificação de Avicel (celulose) e de bétula explodida a vapor (lignocelulose) na presença de LPMO contida no coquetel de celulose Cellic® CTtec2 foram impostas condições como:

- a) Teor de matéria seca 10 ou 20% (m/m);
- b) Condições de aerobiose ou anaerobiose;
- c) Presença ou ausência de doador externo de elétrons (ácido ascórbico);
- d) A 10% de matéria seca 4 e 18h de incubação e a 20% 18 e 46h.

Para a sacarificação do Avicel, obtiveram-se os gráficos apresentados na Figura 9. No gráfico apresentado na Figura 9, estão expostos os resultados obtidos de concentração de glicose (Figuras 9a e 9c) e de Glc4gemGlc (Figura 9b e 9d). O produto oxidado em C4 Glc4gemGlc (4-hydroxy- β -D-xylo-hexopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl) é produzido pela enzima NcLPMO9C durante a sacarificação de materiais lignocelulósicos. O Glc4gemGlc não pode ser clivado pela atividade da β -glicosidase do coquetel enzimático, uma vez que o subsite -1 da β -glicosidase possui alta especificidade de ligação, onde a porção oxidada não reduzida poderia se ligar. Para os painéis a e b, da Figura 9, as barras azuis representam 4 h de incubação, enquanto as barras vermelhas representam 18 h. Para os painéis c e d, as barras azuis representam 18 h de incubação, enquanto as barras vermelhas representam 46 h. As figuras 9 e 10 trazem a indicação de “N₂” e “Air” para indicar condições de reação anaeróbicas e aeróbicas, bem como os sinais “-” e “+” para indicar ausência e presença de ácido ascórbico como agente redutor, respectivamente.

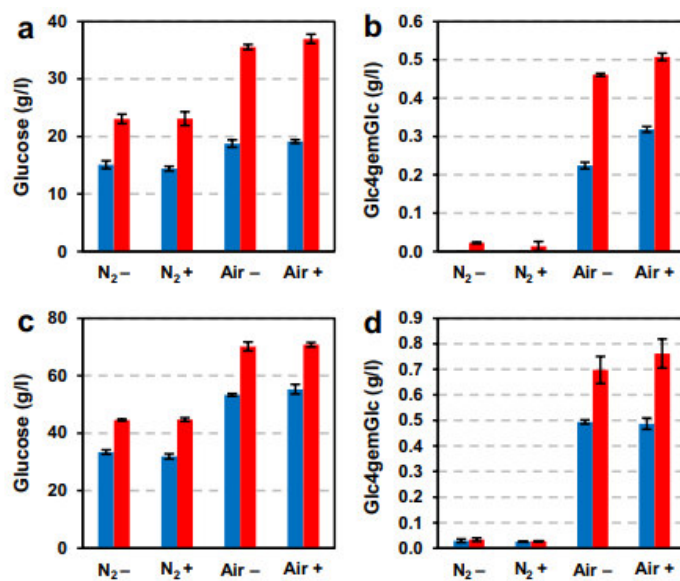
Figura 9 - Sacarificação do Avicel.



Fonte: Müller et al. (2015).

Nas Figuras 10, os resultados para bétula explodida a vapor seca. À semelhança da Figura 9, as barras de cores azuis e vermelhas apresentam o tempo de incubação mencionado.

Figura 10 - Sacarificação da bétula explodida a vapor.

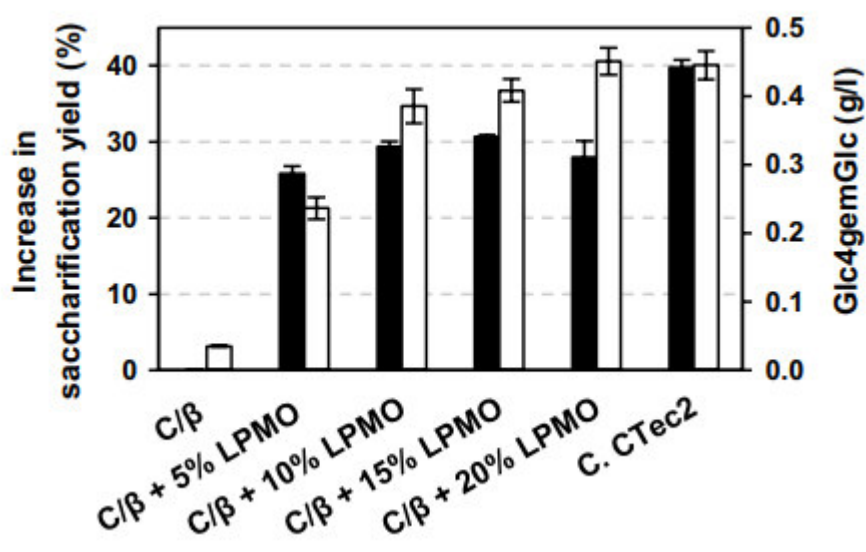


Fonte: Müller et al. (2015).

De acordo com Müller et al. (2015), em condições de aerobiose tanto a 10 quanto a 20% (m/m) de matéria seca houve liberação de cerca de 60% quando comparadas às condições anaeróbicas. O maior rendimento de glicose na presença de oxigênio foi associado à liberação de açúcares oxidados em C4. Em contraste com a sacarificação de Avicel, a adição de um agente redutor não teve efeito no rendimento da sacarificação. A fim de investigar a quantidade ideal de LPMOs em uma preparação de celulase, utilizou-se uma mistura de Celluclast e Novozym 188, que é considerada uma preparação de celulase livre de LPMO, e substituiu-se, progressivamente, de 5 a 20% da proteína na mistura (Figura 11).

A Figura 11 mostra o aumento do rendimento de sacarificação e produção de açúcares oxidados após o fornecimento de Celluclast com *TaLPMO9A* (*Thermoascus aurantiacus*). Incubou-se bétula explodida a vapor a 10% de MS com uma mistura Celluclast/Novozym 188 ("C/β") por 20 h. Várias frações (0 - 20%) do coquetel enzimático foram substituídas pela LPMO. As barras pretas mostram o aumento na liberação de glicose (em %) em comparação com a mistura Celluclast/Novozym 188 sozinha, enquanto as barras brancas mostram a concentração de açúcares oxidados nas misturas de produtos. Para comparação, os resultados de uma reação com Cellic™ CTEC2 ("C. CTec2") foram incluídos.

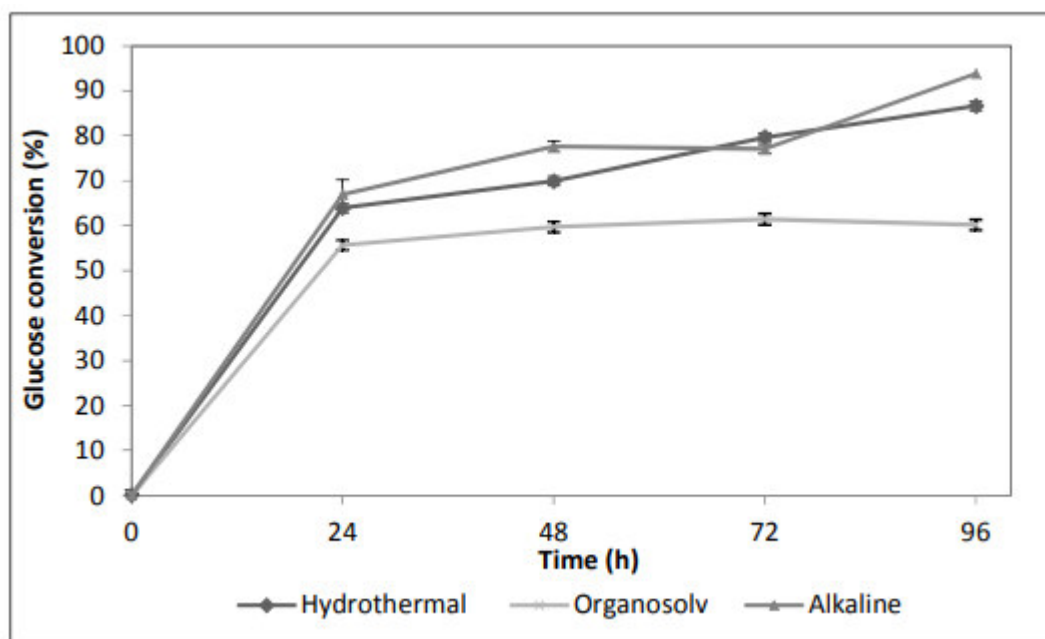
Figura 11 - Aumento de rendimento de sacarificação (%) e liberação de produto oxidado em função do teor de LPMO na mistura



Fonte: Müller et al. (2015).

Outro fator estudado por Rodríguez-Zúñiga et al. (2015) foi a influência do pré-tratamento aplicado. Neste estudo, a hidrólise de bagaço de cana foi monitorada e a concentração de ácido glucônico foi utilizada como marcador da oxidação da celulose que ocorre na posição C1. A Figura 12 apresenta os resultados como o nível de sacarificação da celulose, calculado como a porcentagem de celulose hidrolisada, medindo a concentração de ácido glucônico em relação à concentração de glicose, em cada momento. A hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratada com diferentes tecnologias: hidrotérmica (losango), alcalina (triângulo) e organossolvente (círculo).

Figura 12 - Influência de diferentes tipos de pré-tratamento na conversão de glicose



Fonte: Adaptado de Rodríguez-Zúñiga et al. (2015).

O pré-tratamento com organossolvente (foi utilizado etanol) separa celulose e lignina por extração da lignina da matéria-prima lignocelulósica usando um solvente orgânico. Neste trabalho, o etanol foi empregado como solvente, devido ao seu custo relativamente baixo e capacidade comprovada de deslignificação e solubilização da hemicelulose. O tratamento com soda é um processo clássico de polpação alcalina que é usado principalmente industrialmente para digerir polpas de madeira. Suas vantagens são os altos níveis de celulose remanescente, curtos tempos de processamento e a ausência de formação de subprodutos de enxofre. Outra opção é o pré-

tratamento hidrotérmico ácido frequentemente usado para resíduos agrícolas. Ele remove seletivamente a fração de hemicelulose, aumentando a digestibilidade geral da celulose residual. Nesse caso, a maioria das ligações CLC (complexo lignina-carboidratos) é clivada e as estruturas fenólicas da lignina são reorganizadas, mas não removidas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção e diluição de *primers*

3.1.1 Construção de *primers*

A construção dos *primers* utilizados foi feita com o auxílio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), da plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), na seção de *nucleotide blast*. A síntese dos oligonucleotídeos foi feita pela *Sigma – Aldrich*.

3.1.2 Diluição de *primers*

Com o objetivo de produzir a solução estoque de cada *primer*, foi realizado o procedimento de diluição de *primer* em 100 vezes, isto é, diluindo-o para a concentração de 100 µmol/L. A fim de determinar o volume de água Milli-Q utilizada na diluição dos *primers*, foi utilizada a Equação (1).

$$V = \frac{(nmol) * 1000}{C_f} \quad (1)$$

V : Volume de água Milli-Q que deverá ser adicionado na preparação da solução estoque (µL);

$nmol$: Quantidade de *primer* (nmol);

C_f : Concentração final do *primer* na solução estoque (µmol/L).

3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e purificação dos genes

3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Utilizando-se uma solução de trabalho para aplicação em PCR, a tentativa de amplificação dos genes se deu em triplicata. Estendendo o mesmo protocolo para todas as amostras do conjunto, foi utilizado 1,0 µL de DNA extraído do fungo *A. niveus*, 2,0 µL dos *primers forward* e *reverse*,

10,0 µL do tampão *5x GC buffer*, 3,0 µL de dNTP mix (2,5 mmol/L), 0,5 µL de MgCl₂, 0,5 µL da enzima *Phusion®* DNA polimerase, e avolumou-se para 50 µL finais com água Milli-Q. A rotina de PCR utilizada está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições do termociclador para rotina de PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	98	30 segundos
Ciclos 25x	98	10 segundos
	60	30 segundos
	72	3 minutos
Extensão final	72	10 minutos
Hold	16	∞

Fonte: Arquivo laboratório.

A Tabela 1 apresenta a rotina de PCR com temperatura de anelamento de 60 °C.

3.2.2 Purificação dos genes amplificados por PCR

A fim de isolar e concentrar os fragmentos de DNA obtidos da mistura produto de PCR, foi utilizado o *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, da *GE Healthcare Life Science*. Em seis tubos de 2,0 mL devidamente identificados foram adicionados 500 µL do tampão *capture Buffer type 3* e 100 µL da mistura de PCR de cada amostra em seus respectivos tubos. A solução resultante foi misturada por inversão e adquiriu coloração amarelada.

A solução foi transferida para uma microcoluna em um tubo tipo Eppendorf de 2,0 mL apropriado para a microcoluna e para o processo de centrifugação submetido à temperatura de 4 °C e rotação de 4.500 rpm. Após o descarte da solução que passou pela microcoluna, foram adicionados 500 µL de *wash buffer type 1*, também submetido à centrifugação por 3 minutos a 4.500 rpm. Todavia, a solução passante pela coluna foi descartada junto ao tubo tipo Eppendorf, ao passo que a microcoluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL de armazenamento definitivo.

À microcoluna foram adicionados 50 µL de *elution buffer type 4*, deixado em repouso à

temperatura ambiente por 1 minuto, e, em seguida, centrifugado por 5 minutos a fim de eluir o DNA. Por fim, a coluna foi descartada e a amostra de DNA purificada foi armazenada a -20 °C.

3.3 Amplificação e purificação do vetor pEXPYR

A montagem e amplificação do vetor tiveram como objetivo a transformação em *E. coli* para promover a propagação e o aumento do número de cópias, para sua posterior transformação em fungo.

Em tubos do tipo Eppendorfs de 200 µL numerados de 1 a 5 foram colocadas 1,0 µL de Template pEXPYR (100 pg/µL), 2 µL de LICpEXPYR FWD (190 ng/µL) e de LICpEXPYR REV (130 ng/µL), 10 µL de 5x GC buffer, 2 µL de 10x dNTPs (2,5 mmol/L), 0,5 µL de MgCl₂, 0,5 µL de *Phusion*® DNA polimerase e, por fim, avolumou-se para 50 µL finais com água Milli-Q.

À semelhança da rotina de PCR para a amplificação dos genes e da purificação já elucidada no tópico sobre a purificação dos fragmentos de DNA, uma rotina idêntica foi usada na amplificação e purificação dos vetores.

3.4 Reação de *Ligase Independent Cloning* (LIC)

Para realizar a ligação entre o vetor pEXPYR e o inserto foram utilizados os reagentes destacados na Tabela 2, bem como as quantidades (em µL) utilizadas. Tubos do tipo Eppendorfs de 200 µL devidamente numerados de 1 a 6 foram submetidos a dois passos que consistiram na função incubar do termociclador. No primeiro passo, os seis tubos foram incubados à temperatura de 22 °C durante 30 minutos, enquanto no passo subsequente os tubos foram incubados a 75 °C durante 20 minutos.

Ao fim do segundo passo, os tubos foram retirados do termociclador e deixados resfriando a temperatura ambiente. Em novos tubos, as soluções previamente incubadas foram transferidas na proporção de 1 (vetor):2 (inserto):1 (EDTA), isto é, foram colocados 2 µL de vetor, 4 µL de amostra e outros 2 µL de EDTA (25 mmol/L). O procedimento foi finalizado deixando as soluções resultantes repousarem à temperatura ambiente até o dia seguinte, no qual foi empregada a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% para avaliar o resultado da reação de LIC, isto é, verificar se o vetor havia ou não incorporado o inserto.

Tabela 2 - Reagentes e quantidades utilizados na reação de LIC.

Vetor		Inserito	
Reagente	Volume (µL)	Reagente	Volume (µL)
NEB (10 mmol/L)	2,0	NEB (10 mmol/L)	2,0
DNA	2,0	DNA	4,0
dATP	0,5	dATP	0,5
DTT (100 mmol/L)	1,0	DTT (100 mmol/L)	1,0
BSA (100 mg/mL)	0,2	BSA (100 mg/mL)	0,2
dTaq DNA Polimerase	0,4	dTaq DNA Polimerase	0,4
Água	13,9	Água	11,9
Volume total	20,0	Volume total	20,0

Fonte: Arquivo laboratório.

3.5 Preparação e transformação de células quimiocompetentes de *E. coli*

3.5.1 Preparação de células quimiocompetentes de *E. coli*

Em placas contendo ágar LB, células de *E. coli* foram inoculadas por estriamento e incubadas a 37 °C por uma noite. Cerca de 10 a 12 colônias grandes foram selecionadas e inoculadas em 200 mL de meio SOB em um frasco Erlenmeyer de 1 L e crescidas a 18 °C com vigorosa agitação (200 – 250 rpm) até atingir uma A₆₀₀ de 0,6 – 0,9. Na sequência, o conteúdo do frasco Erlenmeyer foi dividido em 4 tubos do tipo Falcon e estes, por sua vez, foram colocados em gelo durante 10 minutos e centrifugados a 4.500 rpm a 4 °C por 10 minutos. Gentilmente, o *pellet* formado foi ressuscitado em 80 mL de solução TB (20 mL por tubo) e colocado em banho de gelo por 10 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados a 4.500 rpm por 10 minutos a 4 °C e o *pellet* formado em cada tubo foi ressuscitado em 5 mL de solução TB e juntados. Foi adicionado, por fim, 1,4 mL de DMSO e a suspensão foi gentilmente agitada e mantida em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, as células foram depositadas em tubos e congeladas em nitrogênio líquido (INOUE; NOJIMA; OKAYAMA, 1990).

3.5.2 Transformação por choque térmico de células quimiocompetentes de *E. coli*

As células competentes armazenadas a -80°C foram colocadas em gelo para descongelar. Em seguida, em seis tubos estéreis numerados de 1 a 6 foram adicionados $2\ \mu\text{L}$ da reação de LIC em seus respectivos tubos e $100\ \mu\text{L}$ das células competentes.

3.5.3 Armazenamento das colônias transformadas em solução estoque

A preparação da solução estoque para armazenamento das colônias bacterianas transformantes positivas, que se encontravam em água Milli-Q estéril, foi feita em tubos de $1,5\ \text{mL}$ com $1\ \text{mL}$ de meio LB (triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio com pH da solução final ajustado para 7,0), $1\ \mu\text{L}$ de ampicilina e $0,5\ \text{mL}$ de uma solução de glicerol 70%. As colônias foram transferidas para sua respectiva solução estoque e armazenadas a -80°C .

3.6 Inóculo e Mini prep das colônias em solução estoque

3.6.1 Inóculo das colônias

As colônias contidas em solução estoque foram inoculadas em tubos Falcon estéreis com $5\ \text{mL}$ de meio LB líquido, 1% de ampicilina (foram utilizados $5\ \mu\text{L}$ de ampicilina na concentração de $100\ \text{mg/mL}$) e $20\ \mu\text{L}$ da solução estoque. Os tubos foram inseridos em um *shaker* à temperatura de 37°C e rotação de $180\ \text{rpm}$ até o dia seguinte.

3.6.2 Mini prep (Extração de DNA plasmidial)

O protocolo a seguir foi extraído do *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit*, do fabricante *GE Healthcare*. Em tubos do tipo Eppendorf de $1,5\ \text{mL}$ não estéreis foram colocados $1,5\ \text{mL}$ do cultivo e centrifugou-se durante 5 minutos a $13.300\ \text{rpm}$. O procedimento foi repetido por três vezes, totalizando um volume de $4,5\ \text{mL}$. Ao final de cada centrifugação resultou um *pellet* que foi ressuspendido com $175\ \mu\text{L}$ de *buffer type 7*. Em seguida, foram adicionados $175\ \mu\text{L}$ de *Lysis buffer type 8* e o conteúdo misturado por inversão. Depois de misturados, foram adicionados $350\ \mu\text{L}$ de *Lysis buffer type 9* e novamente misturado por inversão. Observou-se a formação de um *pellet*

branco no fundo do tubo, o qual foi descartado após o sobrenadante ter sido transferido para uma coluna, no interior de um tubo coletor próprio do kit, que possui uma membrada a base de sílica. O sobrenadante foi centrifugado duas vezes durante 1 minuto a 13.300 rpm. Foram adicionados 400 µL de *Wash buffer type 1* à coluna e centrifugou-se por 1 minuto a 13.300 rpm. Novamente, o que passou pela coluna foi descartado. Finalizando o procedimento de Mini prep, a coluna foi transferida para novos tubos de 1,5 mL numerados de 1 a 6 e foram adicionados à coluna 100 µL de *Elution buffer type 4*, deixando repousar sobre a bancada por 1 minuto à temperatura ambiente e, por fim, foi realizada a última centrifugação durante 2 minutos e 13.300 rpm. O eluente foi armazenado a -20 °C e a coluna descartada.

3.7 Transformação em *A. nidulans* linhagem A773

3.7.1 Inóculo dos esporos em meio sólido

O mutante *A. nidulans* A773 obtido no *American Type Culture Collection* (ATCC) foi mantido em refrigerador após cultivo sobre meio mínimo, pH 6,5, contendo 5% de solução de sais (12% de NaNO₃, 1,4% de KCl, 1,4% de MgSO₄.7H₂O, 3,4% de KH₂PO₄), 0,2% de solução de elementos traços (2,2% de ZnSO₄.7H₂O, 1,1% de H₃BO₃, 0,5% de MnCl₂.4H₂O, 0,5% de FeSO₄.7H₂O, 0,16% de CoCl₂.5H₂O, 0,16% de CuSO₄.5H₂O, 0,11% de Na₂MoO₄.4H₂O e 5% de Na₂EDTA), 1% de glicose e 2% de ágar. Por se tratar de um mutante deficiente na síntese de bases nitrogenadas, o meio foi acrescido ainda de uracila (2,5 mg/L), uridina (2,5 mg/L) e piridoxina (1 mg/L) (SEGATO et al., 2012). O fungo foi incubado em estufa a 37 °C por 2 dias.

3.7.2 Inóculo no meio líquido e obtenção de protoplastos

Inoculou-se aproximadamente 10⁶ esporos do mutante *A. nidulans* A773 em meio mínimo líquido (em 250 mL de meio suplementado com: uracila, uridina e piridoxina). O cultivo foi mantido sob agitação a 180 rpm, a 37 °C durante 18 horas e, após o período de incubação, a cultura foi filtrada em papel de filtro Whatman n°1 e o micélio foi lavado com MgSO₄ 0,6 mol/L e em seguida com solução DSPS (KCl 1,1 M, ácido cítrico 0,1 mol/L, pH ajustado para 5,8 com KOH e esterilizado por filtração). A massa micelial foi transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL estéril e adicionou-se 500 mg de *Lysing enzymes from Trichoderma harzianum* (Sigma L1412),

250 mg de *Lysozyme from Chicken Egg White* (Sigma L7651) e 5 mL da solução DSPS. A mistura foi incubada a 30°C e 100 rpm por aproximadamente 2 horas, até não haver mais presença visível de precipitados e estar completamente líquida.

Os protoplastos foram recolhidos por filtração em membrana *Miracloth* (Calbiochem®) em funil de Büchner com sucção, coletados em tubo de centrifuga de 50 mL estéril e centrifugados a 400 rpm por 15 minutos. O *pellet* formado foi lavado duas vezes por centrifugação a 400 rpm por 15 minutos, com 45 mL de solução STC50 (sorbitol 1,2 mol/L, Tris 50 mmol/L, CaCl₂ 10 mmol/L, pH 7,5, autoclavado e mantido a 4 °C) para remoção das enzimas de protoplastização. Por fim, o precipitado foi ressuscitado com 1 mL de STC50 (PUNT; VAN DEN HONDEL, 1992).

3.7.3 Transformação

Para a transformação de *A. nidulans* A773 com os vetores contendo os genes que codificam as LPMOs, aproximadamente 5 µg do DNA plasmidial foram adicionados em um tubo estéril de 15 mL. O volume final foi ajustado para 100 µL com STC50 e adicionou-se 200 µL da suspensão contendo os protoplastos. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos, etapa em que os plasmídeos com cargas negativas ficarão ao redor dos protoplastos, cuja membrana estará carregada positivamente, em seguida adicionou-se 2 mL da solução PEG 60% (6 g de PEG 4.000 em 5 mL de STC50). A solução de PEG 60% e a suspensão de foram agitadas cuidadosamente para evitar a ruptura dos protoplastos e mantidas à temperatura ambiente por 20 minutos. O PEG é responsável por levar à fusão e aglutinação dos protoplastos, possibilitando a incorporação de plasmídeos dispersos no citosol e, em seguida, incorporação ao genoma do fungo. Após este período, adicionou-se 8 mL de STC50 e homogeneizou-se a mistura. Em seguida, 2 mL da mistura foi plaqueada em meio mínimo para recuperação de protoplastos (meio mínimo acrescido de sorbitol 1,2 mol/L). Incubou-se por 1 dia a 37 °C e após esse período as placas foram invertidas, permanecendo outras 24 horas nas mesmas condições de incubação e, por fim, os transformantes foram obtidos (TILBURN et al., 1983).

3.8 Inóculo dos transformantes positivos em meio líquido e quantificação das proteínas totais

Após a seleção de transformantes positivos, as colônias do mutante *A. nidulans* A773 foram transferidas para placas de Petri (60 x 15 cm) contendo meio de expressão de maltose como indutor (0,1% de elementos traços, 5% de solução de sais, 5% de maltose e 0,1 mg.L⁻¹ de piridoxina) e pH 6,5. O volume utilizado de meio líquido em escala reduzida foi de, aproximadamente, 20 mL por placa de Petri, ao passo que o volume em escala ampliada foi de 500 mL. Ambos os cultivos estacionários foram mantidos a 37 °C por cerca de 48 horas. Após o período de incubação, os meios cultivados foram filtrados em papel de filtro, no caso da escala reduzida, e em membrana Miracloth, no caso de escala ampliada, e o extrato enzimático foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE 15% e, em seguida, corado com Azul de Coomassie.

Para a seleção dos extratos enzimáticos a serem analisados, foi utilizada a metodologia de quantificação de proteínas totais descrita por Bradford (1976), cujas leituras de absorbâncias foram efetuadas em espectrofotômetro a 595 nm. Nas tabelas apresentadas neste relatório, organizaram-se os resultados obtidos quando aplicada a metodologia de Bradford.

Nestas tabelas constam os seguintes itens: AVG, OD, µg e “to 10”. Os valores de AVG são indicativos de *average* (média) e aponta para a média aritmética da absorbância das triplicatas. Os valores na linha denotada por OD, indicativa de *optical density* (densidade ótica), apontam para a diferença entre as absorbâncias das amostras e do branco. As células de µg são indicativas do teor de proteínas totais em µg, nas quais são utilizadas o fator de correção 0,1504 (coeficiente angular da curva padrão, obtida utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) em várias concentrações (Apêndice A). Já as células de “to 10” indicam o volume, em µL, para obter um total de 10 µg de amostra.

3.9 Diálise e concentrações dos extratos enzimáticos

A fim de promover a remoção do resíduo de maltose presente nos meios cultivados, a partir dos quais foram obtidos os extratos enzimáticos utilizados na quantificação de açúcar redutor, segundo a metodologia de Miller (1959), utilizou-se da mistura dos extratos enzimáticos junto ao tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L e pH 6,5. Essa mistura foi transferida para um tubo Vivaspin® 6 MWCO 5000 e, em seguida, centrifugada sucessivas vezes em rotação de 3.800 rpm

durante 30 minutos. Em escala reduzida, dialisou-se até que mistura reacional derivada da reação com DNS apresentasse, visualmente, semelhança apreciável com o branco da amostra, uma vez que os testes de atividade desenvolvidos nessa etapa se restringiram à análise qualitativa e visual, com o objetivo de avaliar a existência de atividade pelo método do açúcar redutor.

Na ampliação de escala, o volume de meio líquido de maltose 5% utilizado foi de 500 mL, e, após a filtração do meio cultivado em membrana Miracloth, o extrato enzimático foi concentrado em *Amicon Stirred Cell* (Millipore), de capacidade 200 mL, com uma membrana com corte de 10 kDa. Junto ao filtrado foi adicionado o tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L e pH 7, objetivando alterar a carga da proteína a ser purificada, possibilitando efetuar as etapas de purificação da amostra pelo mecanismo de troca iônica, em que foram utilizadas soluções de fosfato de sódio 50 mmol/L e NaCl 1 mol/L, em pHs de 6,5 e 7,5.

3.10 Purificação

3.10.1 Purificação por troca iônica

Na ampliação de escala, foi dado início às etapas de purificação da amostra, que, inicialmente, tiveram como intuito verificar em qual concentração de uma solução de fosfato de sódio 50 mmol/L e concentração variável de NaCl, a 100 mmol/L, 200 mmol/L, 300 mmol/L, 400 mmol/L, 500 mmol/L e 1 mol/L, a enzima seria eluída, o que constitui a técnica de purificação por troca iônica. Mais que uma tentativa de purificação inicial, essa etapa teve como intuito a purificação generalizada do extrato bruto, retirando boa parte dos resíduos do meio de cultivo dissolvidos. Na etapa inicial de purificação, utilizou-se uma coluna de bancada, de capacidade 20 mL, dos quais 15 mL foram designados a serem preenchidos por tampão de fosfato de sódio contendo NaCl em diferentes concentrações, junto a 3 mL da resina DEAE Sepharose GL6B. A Tabela 3 mostra as respectivas concentrações de NaCl, em fosfato de sódio 50 mmol/L, utilizadas, que inicialmente se encontrava em concentração de 1 mol/L, e os respectivos volumes do tampão fosfato de sódio utilizados na diluição.

Tabela 3 - Diluições da solução de NaCl em tampão de fosfato de sódio a 50 mmol/L para purificação por troca iônica.

Concentração de NaCl (mmol/L)	Volume de solução de NaCl a 1 mol/L (mL)	Volume de tampão de Na ₂ PO ₄ a 50 mmol/L (mL)
100	1,5	13,5
200	3,0	12
300	4,5	10,5
400	6,0	9
500	7,5	7,5
1.000	15,0	-

Fonte: Próprio autor.

Após passar o extrato enzimático na resina DEAE Sepharose GL6B, o filtrado foi coletado e submetido à purificação nas diversas concentrações de NaCl, com o objetivo de verificar em qual concentração o mecanismo de troca iônica foi efetivo. Cada fração foi coletada separadamente e armazenada. Posteriormente, concentrou-se cerca de 1 mL das frações coletadas para análise em eletroforese SDS-PAGE 15%.

Outra técnica de purificação por troca iônica empregada foi possível utilizando-se uma coluna do tipo *Resource Q* no sistema ÄKTA™ (*GE Healthcare*). A coluna é constituída de uma fase estacionária, em que se é utilizado *Source 15Q* como permutador aniônico. Essa técnica foi empregada após as primeiras tentativas de purificação por troca iônica na coluna de 20 mL, constituindo um pré-tratamento da amostra, e por exclusão de tamanho. Nessa etapa, foram utilizados tampões de fosfato de sódio 50 mmol/L e pH 6,5, além de uma solução tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L com 1 mol/L de NaCl, também em pH 6,5. Tentativas subsequentes de purificação contaram com a alteração do pH das soluções para 7,5.

3.10.2 Purificação por exclusão de tamanho

A tentativa de purificação por exclusão de tamanho, ou gel-filtração, contou com a utilização de uma coluna Superdex 75 10/300 GL, comercializada pela empresa *GE Healthcare*, apropriada para identificação de proteínas de peso molecular entre 3 e 70 kDa. A solução tampão de 50 mmol/L de fosfato de sódio de pH 6,5 foi utilizada para eluir em 1,5 mL as frações coletadas.

3.11 Aprofundamentos realizados

Em relação ao trabalho realizado na Iniciação Científica, de cunho puramente experimental, esta monografia apresentará como aprofundamento, nas seções de resultados e conclusão, um estudo acerca da viabilidade econômica da utilização das enzimas LPMOs em coquetéis enzimáticos aplicados em biorrefinarias, especialmente àquelas de cana de açúcar. Além disso, serão aprofundadas as investigações dos resultados, sejam estes esperados ou não, obtidos ao fim do período da Iniciação Científica à luz de novos estudos realizados com esta classe de enzimas.

3.12 Cronograma das atividades

O desenvolvimento das atividades propostas por este trabalho obedeceu ao cronograma apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Cronograma de atividades

Atividades	2015						2016						2019						2020	
	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai - Jul	Ago	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Jan - Mai	Jun
Procedimento experimental	x	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x									
Revisão bibliográfica										x	x		x	x	x					
Elaboração da monografia														x	x	X				
Análises											x									
Discussão dos resultados											x	x				x	x			
Revisão de texto e conclusão												x					x			
Entrega de TCC I																		x		
Aprofundamento																			x	
Entrega de TCC II																				X

Fonte: Próprio autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção de *primers*

No Quadro 3, são apresentadas as sequências de bases que estruturam os oligonucleotídeos e foram identificadas pelo nome da proteína seguido de seu respectivo clan. As trincas em **negrito** constituem a cauda de cada sequência de bases para inserção no vetor.

Quadro 3 - Sequência de primers utilizados na amplificação por PCR.

Primer	Sequência (5'-3')
LPMO clan2 fwd	GGG TTG GCA CAT ACC ACC TTC ACG ACC
LPMO clan2 rev	GTC CCG TGC CGG TTA TTT TTC AAT AGC TTC TAA GTG GAT ATC
LPMO clan3_1 fwd	GGG TTG GCA CAC TAC GTT TTC TCC AAG CTC ATT G
LPMO clan3_1 rev	GTC CCG TGC CGG TTA GAT ACA CTG GTA GTA GTA AGG GTT GTA
LPMO clan3_2 fwd	GGG TTG GCA CAT TAT TTC TTT GAC GTC CTT GTT ATC G
LPMO clan3_2 rev	GTC CCG TGC CGG TTA GGG CTT GAA CTG ACG AG
LPMO clan4 fwd	GGG TTG GCA CAT GGT CAT GTT ACA AAC ATC GTA ATC A
LPMO clan4 rev	GTC CCG TGC CGG TTA CTA GGA GGC GGT TGG AAT G
LPMO clan5_1 fwd	GGG TTG GCA CAC GGT TTT GTG ACG GGT GCC GTT
LPMO clan5_1 rev	GTC CCG TGC CGG TTA AGC AGA GAG ATC ACG AGC GTG CAC CTT
LPMO clan5_2 fwd	GGG TTG GCA CAC GGC TTT GTT TCT GGC ATT GTT GCT GAT
LPMO clan5_2 rev	GTC CCG TGC CGG TTA AGC GTT GAA CAG TGC AGG ACC AGG AAT

Fonte: Próprio autor.

A Tabela 4 contém as informações do nome dos genes arbitrariamente atribuído, seu número correspondente, entre parênteses, para indicação em futuras análises e o tamanho expresso em pares de bases. Por meio dela, pode-se inferir e comparar os resultados obtidos em análises de aplicação em gel de agarose 1% (m/v) com as informações fornecidas pelo fabricante, que estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Genes estudados e seus respectivos tamanhos, em pb.

Gene	Tamanho (pb)
LPMO clan2 (1)	1.464
LPMO clan3_1 (5)	933
LPMO clan3_2 (2)	822
LPMO clan4 (4)	966
LPMO clan5_1(3)	1.065
LPMO clan5_2 (6)	690

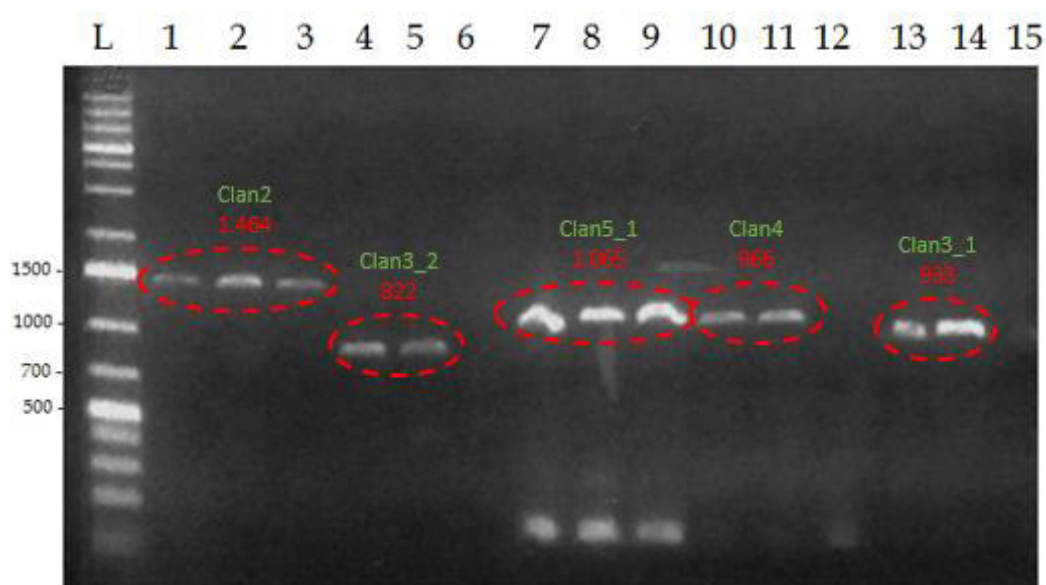
Fonte: Próprio autor.

4.2 Amplificação dos genes

A fim de amplificar os genes provenientes do organismo *A. niveus*, foram utilizadas as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v).

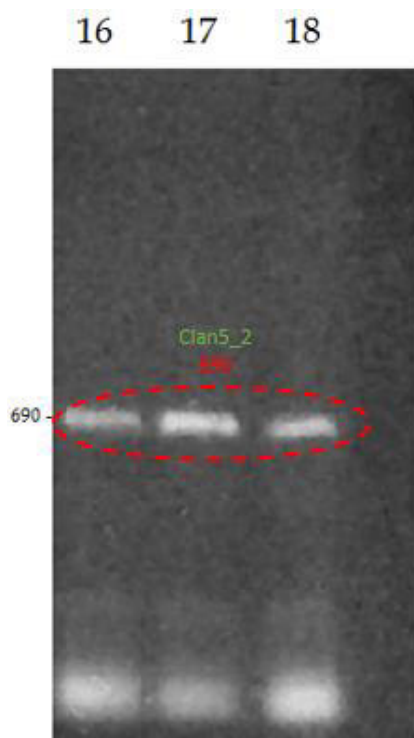
O resultado expresso nas Figuras 13 e 14 evidencia a amplificação bem-sucedida de alguns genes. O procedimento foi realizado em triplicata. L, Ladder (marcador de peso molecular); 1, 2, 3 LPMO clan 2; 4, 5, 6 LPMO clan 3_2; 7, 8, 9 LPMO clan 5_1; 10, 11, 12 LPMO clan 4; 13, 14, 15 LPMO clan 3_1.

Figura 13 - Eletroforese em agarose 1% evidenciando a amplificação dos genes.



Fonte: Arquivo próprio.

Figura 14 - Gel de eletroforese evidenciando a amplificação dos genes de LPMO clan 5_2.



Fonte: Arquivo próprio.

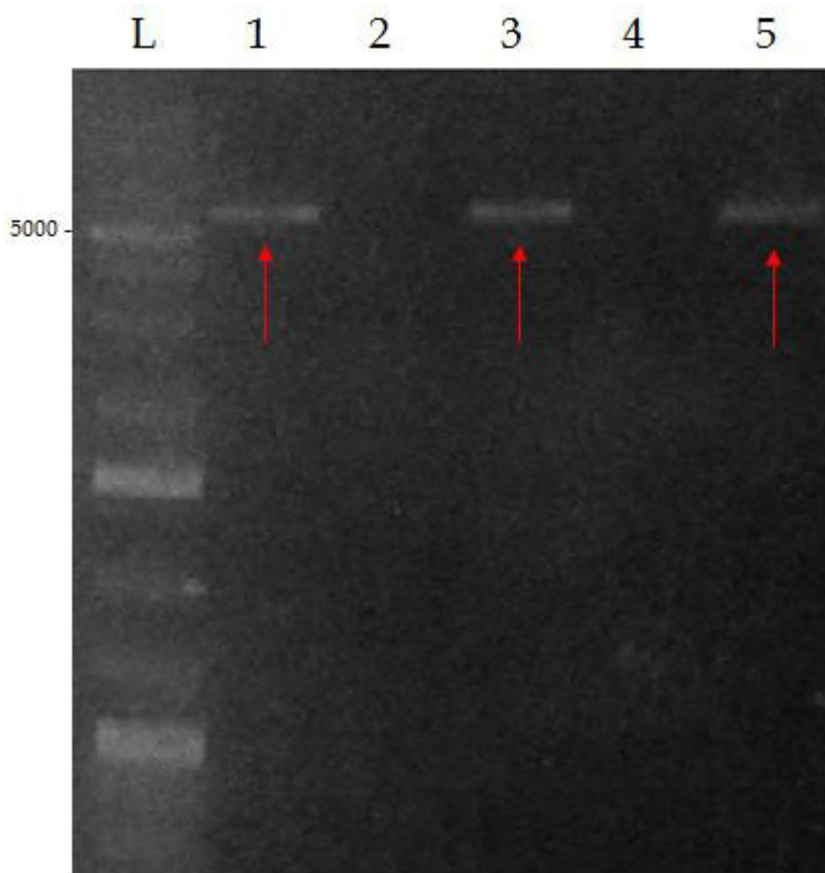
Procedimento realizado em triplicata para 16, 17, 18 LPMO clan 5_2.

O procedimento realizado em triplicata mostra a amplificação bem-sucedida dos genes denotados por 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17 e 18, dos quais os de números 7, 8, 9 e 14 apresentam uma banda mais expressiva, ao passo que os genes denotados por 6, 12 e 15 não foram amplificados. Tal resultado evidencia a eficiência do procedimento, que foi estendido para todas as amostras do conjunto. A explicação para a não amplificação de uma dentre três amostras de um mesmo gene se sustenta nos possíveis erros aleatórios, como a manipulação incorreta da pipeta ou a utilização de volumes inapropriados dos primers, por exemplo.

4.3 Amplificação do vetor pEXPYR

Foram utilizadas cinco amostras para aplicação em PCR, cujo gel de eletroforese forneceu a Figura 15.

Figura 15 - Gel de eletroforese evidenciando a amplificação do vetor.



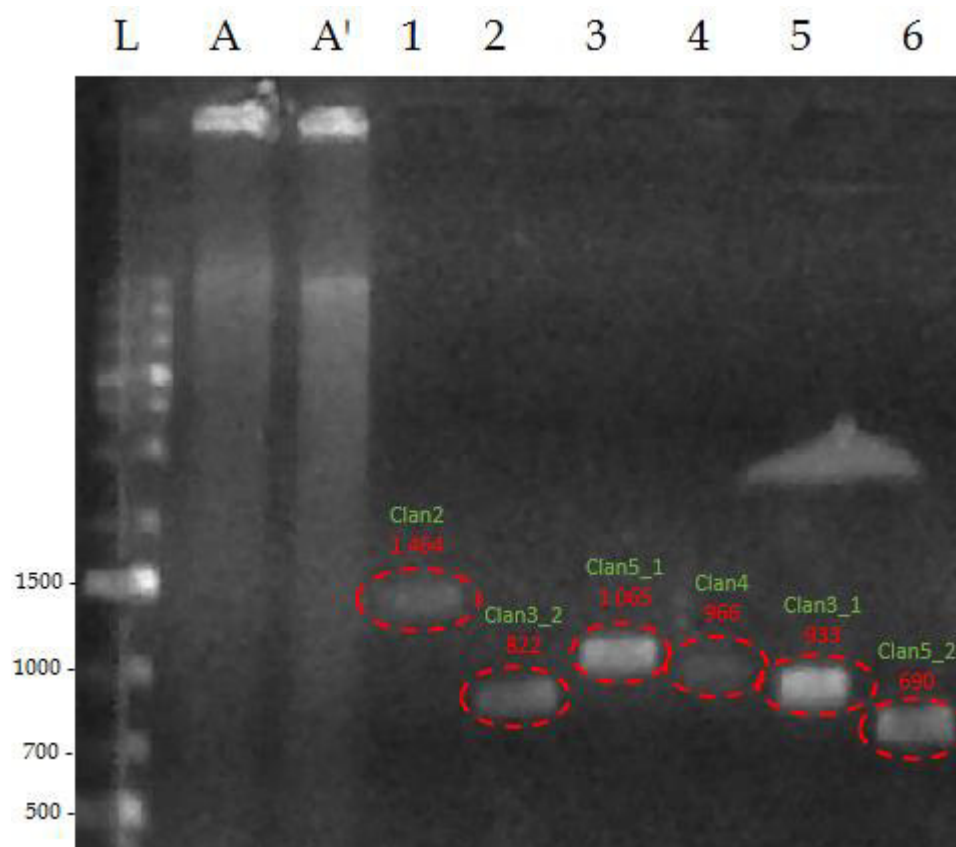
Fonte: Arquivo próprio.

A Figura 15 apresenta a eletroforese em gel de agarose 1% contendo cinco amostras do vetor pEXPYR, cuja amplificação foi obtida por PCR. L, Ladder; 1, vetor 1; 2, vetor 2; 3, vetor 3; 4, vetor 4; 5, vetor 5.

A amplificação de três dos cinco vetores pretendidos é apresentada na Figura 15. Denotados pelos números 1, 3 e 5, os vetores satisfatoriamente amplificados passaram para a etapa seguinte, que consistiu na reação de LIC para inserto dos genes nos vetores pEXPYR amplificados, purificados e concentrados.

4.4 Gel da reação de Ligase Independent Cloning (LIC)

Figura 16 - Gel de eletroforese para confirmar a incorporação do inserto pelo vetor

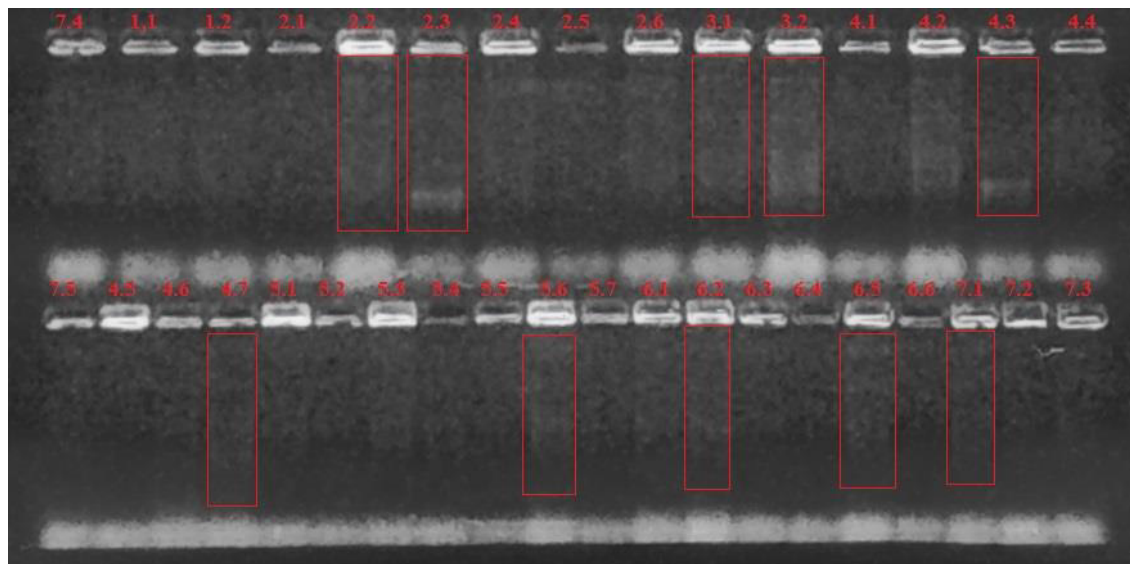


Fonte: Arquivo próprio.

Eletroforese em gel de agarose 1% resultante do PCR realizado com os produtos da reação de LIC (1 a 6) e da amplificação do DNA do fungo *A. niveus* (A e A') contendo duas amostras. Da esquerda para a direita, os vetores de expressão contendo os insertos: L, Ladder; A e A', DNA de *A. niveus*; 1, LPMO clan 2; 2, LPMO clan 3_1; 3, LPMO clan 5_1; 4, LPMO clan 4; 5, LPMO clan 3_2; 6, LPMO clan 5_2.

4.5 Gel do PCR de colônia

Figura 17 - Reação de PCR com as colônias selecionadas



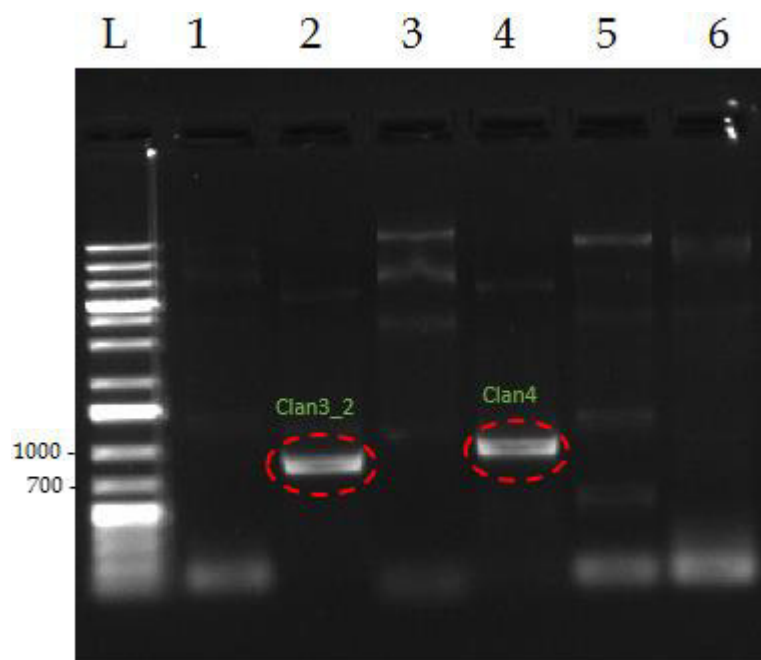
Fonte: Arquivo próprio.

O gel de eletroforese resultante do PCR das colônias selecionadas. As bandas no interior dos retângulos vermelhos sinalizam a amplificação dos genes considerados satisfatórios para continuar com os procedimentos.

Os DNAs selecionados para dar sequência aos experimentos foram os de número 2.3 (LMPO clan 3_2), 3.2 (LPMO clan 5_1), 4.3 (LPMO clan 4), 5.6 (LPMO clan 3_1) e 6.5 (LPMO clan 5_2). Como é possível observar na Figura 17, as cepas de número 1 (LPMO clan 2) não tiveram qualquer amplificação, ao passo que mesmo no caso de algumas linhagens selecionadas (3.2, 5.6, 6.5) não houve a amplificação esperada, resultando em bandas pouco expressivas e em arraste.

Embora a amplificação não tenha sido tão expressiva quanto a pretendida, foi possível notar a presença de transformantes positivos acentuados em 2.3 e 4.3, que se revelaram, em PCRs futuros do Miniprep das colônias, como bem amplificados (Figura 18).

Figura 18 - PCR de colônia posterior ao Miniprep



Fonte: Arquivo próprio.

Na Figura 18, da esquerda para a direita: L, Ladder; 1, LPMO clan 2; 2, LPMO clan 3_2; 3, LPMO clan 5_1; 4, LPMO clan 4; 5, LPMO clan 3_1; 6, LPMO clan 5_2.

A Figura 18 é resultado de um PCR de colônia realizado após o miniprep. A amplificação satisfatória pode ser constatada em apenas duas bandas. Tal resultado foi obtido após a primeira tentativa de transformação em *A. nidulans*, na qual foram utilizados 4 dos 6 DNAs, não obtendo sucesso na expressão das proteínas pretendidas. Os procedimentos seguintes, realizados após a obtenção do gel acima, conta com a utilização de apenas LPMO clan 3_2 (2) e LPMO clan 4 (4), isto é, apenas daqueles que obtiveram sucesso na amplificação após o miniprep.

4.6 Quantificação, análise e atividade de enzimas em escala reduzida

4.6.1 Representação e análise das enzimas estudadas

Após algumas tentativas de expressar as LPMOs estudadas, obtiveram-se alguns transformantes positivos, que, após inoculados em meio líquido de maltose 5% como indutor, foi

possível realizar testes para comprovar a expressão das enzimas pretendidas. Ao longo deste relatório, diversas referências são feitas às proteínas trabalhadas no que tange suas características estruturais. Para fins de comparação, são apresentados na Tabela 5 dados relativos ao peso molecular, ponto isoelétrico teórico (pI) e número de aminoácidos de cada proteína estudada. Tais dados foram obtidos dos softwares BLASTP, do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), e ExPASy.

Tabela 5 - Proteínas estudadas e seus respectivos pesos moleculares, ponto isoelétrico teórico (pI) e número de aminoácidos (aa).

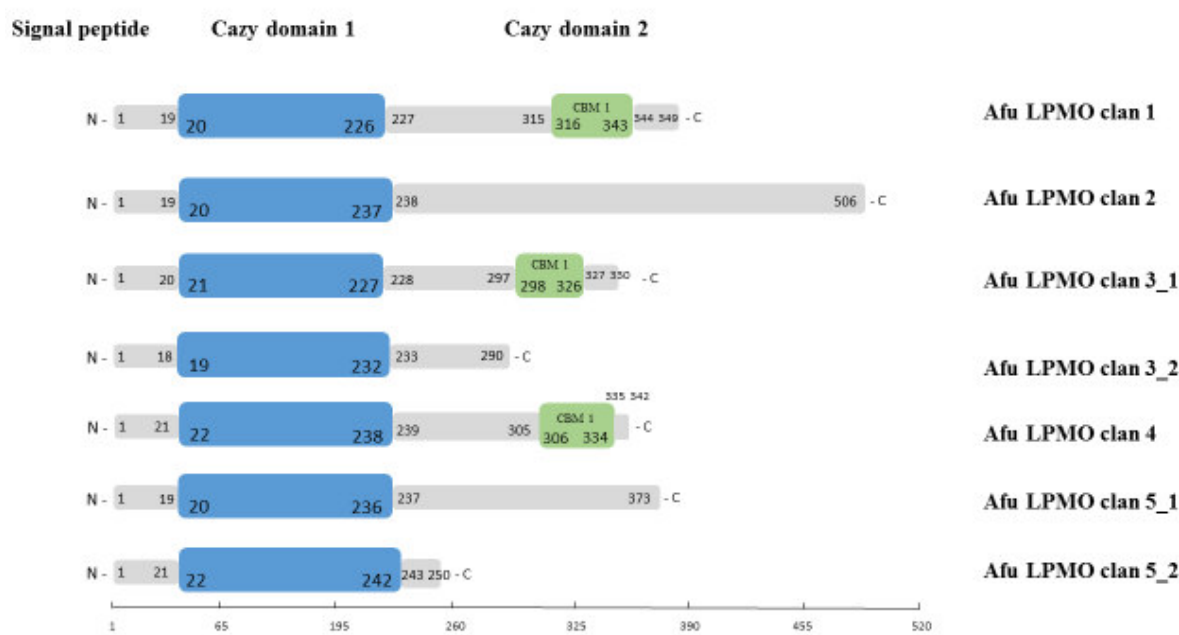
	Peso molecular (kDa)	pI teórico	nº de aa
LPMO clan2 (1)	52,3	6,56	506
LPMO clan3_1 (5)	33,4	5,51	330
LPMO clan3_2 (2)	36,6	4,8	290
LPMO clan4 (4)	33,2	4,85	342
LPMO clan5_1(3)	29,9	8,2	373
LPMO clan5_2 (6)	24,2	4,96	250

Fonte: BLASTP e ExPASy.

A Figura 19 é uma representação esquemática da modularidade de AA9 LPMO de *A. fumigatus*, segundo a classificação do CAZy, que apresenta estreita semelhança com *A. niveus*, estudado neste trabalho.

As primeiras regiões em cinza representam o peptídeo sinal, enquanto a região em azul representa o domínio catalítico e a verde indica a existência de módulos de ligação ao carboidrato (CBM), isto é, uma sequência de aminoácidos dentro de uma enzima ativa em carboidratos.

Figura 19 - Representação esquemática da modularidade de LPMO AA9 de *A. fumigatus*



Fonte: Arquivo próprio.

4.6.2 Quantificação de proteínas totais

A quantificação do teor de proteínas totais dos extratos enzimáticos obtidos a partir da filtração dos meios de cultivo por gravidade em papel de filtro resultou em 14 amostras, referenciadas por 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8, totalizando 14 colônias de *A. nidulans* transformadas. Tal quantificação foi realizada por meio da metodologia de Bradford (1976), e os resultados obtidos foram organizados nas tabelas abaixo (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6 - Amostras de 2.1 a 4.1.

<>	Branco	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	4.1
1	0,2963	0,9799	0,8487	1,4798	0,4061	1,4814	0,6665	1,3308
2	0,3059	1,0103	1,1433	1,3505	0,4526	1,5361	0,7057	1,3324
3	0,3139	0,9673	1,2392	1,4703	0,4278	1,4375	0,6898	1,3272
AVG	0,3054	0,9858	1,0771	1,4335	0,4288	1,4850	0,6873	1,3301
OD	0,0000	0,6805	0,7717	1,1282	0,1235	1,1796	0,3820	1,0248
µg		0,0452	0,0513	0,0750	0,0082	0,0784	0,0254	0,0681
para 10		221,0248	194,8944	133,3136	1.218,1425	127,4972	393,7516	146,7651

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 7 - Amostras de 4.2 a 4.8.

<>	Branco	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8
1	0,3051	1,5885	1,2365	0,4585	1,5389	0,6913	1,2986	1,4840
2	0,3338	1,5598	1,2347	0,4818	1,4349	0,6889	1,3175	1,5897
3	0,3443	1,4821	1,2694	0,4858	1,6273	0,7315	1,3377	1,4948
AVG	0,3277	1,5435	1,2469	0,4754	1,5337	0,7039	1,3179	1,5228
OD		1,2157	0,9191	0,1476	1,2060	0,3762	0,9902	1,1951
µg		0,0808	0,0611	0,0098	0,0802	0,0250	0,0658	0,0795
para 10		123,7113	163,6324	1.018,7401	124,7132	399,8228	151,8885	125,8472

Fonte: Arquivo próprio.

Os dados das tabelas 6 e 7 são provenientes dos testes em triplicata dos extratos filtrados. Objetivou-se, por meio deles, a seleção dos extratos que apresentaram o maior teor de proteína totais, o que levou à seleção de 8 dos 14 filtrados, sendo 4 de LPMO clan 3_2 (2) e 4 de LPMO clan 4 (4). Os extratos selecionados foram indicados com marcação verde nas tabelas 6 e 7.

Os extratos foram concentrados em tubos *Vivaspin® 500* com corte de 5 kDa e capacidade de, aproximadamente, 2,2 mL. Inicialmente, perfaziam-se cerca de 20 mL de volume total de extrato, e, ao final da concentração, reduziu-se para 1 mL (concentrado em 20x). Novamente, foi utilizada a técnica de Bradford, desta vez para o extrato concentrado, obtendo as Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Absorbâncias dos extratos concentrados da LPMO clan 3_2 (2).

<>	Branco	2.1	2.2	2.3	2.5
1	0,3323	0,5898	0,4829	0,5024	0,6164
2	0,3491	0,6459	0,5430	0,5207	0,6540
3	0,3106	0,6512	0,5538	0,4930	0,6372
AVG	0,3307	0,6290	0,5266	0,5054	0,6359
OD	0,0000	0,2983	0,1959	0,1747	0,3052
µg	0,0000	1,9834	1,3025	1,1616	2,0293
para 10		5,00	7,70	8,60	4,90

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 9 - Absorbâncias dos extratos concentrados da LPMO clan 4 (4).

<>	Branco	4.1	4.2	4.5	4.8
1	0,3324	0,5306	0,5324	0,5495	0,5570
2	0,2716	0,5130	0,4738	0,6799	0,5606
3	0,3260	0,5262	0,5120	0,6552	0,5941
AVG	0,31	0,5233	0,5061	0,6282	0,5706
OD	0,0000	0,2133	0,1961	0,3182	0,2606
µg	0,0000	1,4180	1,3036	2,1157	1,7325
para 10		7,10	7,70	4,70	5,80

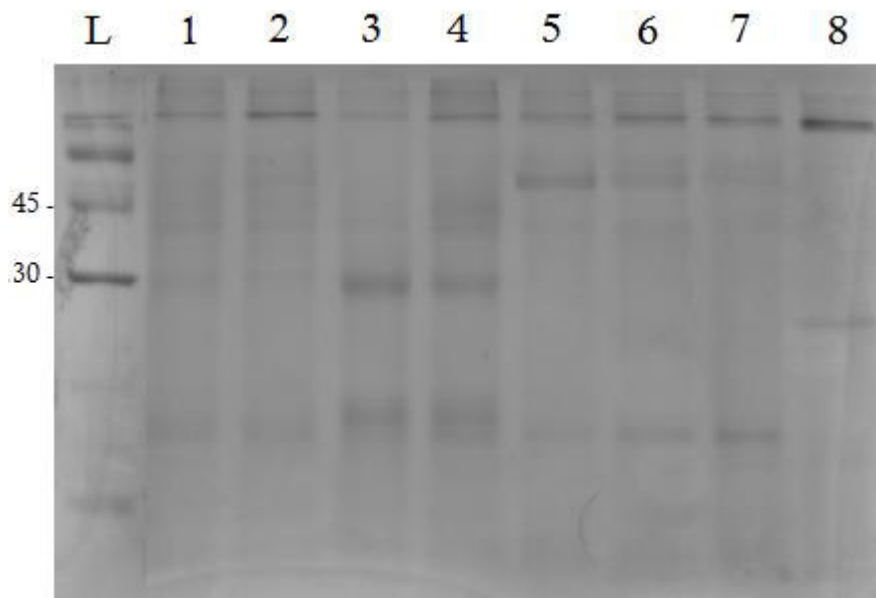
Fonte: Arquivo próprio.

A obtenção dos valores apresentados nas Tabelas 8 e 9 possibilitou a análise dos extratos concentrados em eletroforese de SDS-PAGE 15%. A quantidade de cada extrato aplicada na eletroforese foi de 10 µg, o que corresponde, em µL, aos valores nas Tabelas 8 e 9.

4.6.3 Análise dos extratos enzimáticos em eletroforese SDS-PAGE

O gel de SDS-PAGE obtido das amostras concentradas (Figura 20) foi corado com Azul de Coomassie, e, posteriormente, descorado com destain.

Figura 20 - Gel de SDS-PAGE das amostras concentradas.



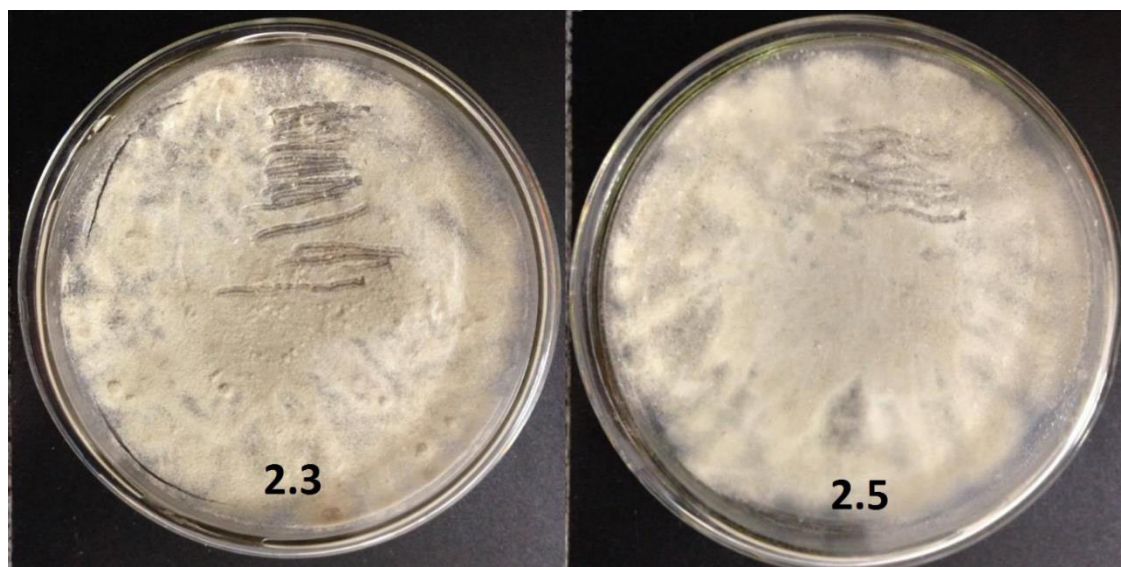
Fonte: Arquivo próprio.

Na Figura 20: L, marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb plus; 1 (2.1), 2 (2.2), 3 (2.3) e 4 (2.5) LPMO clan 3_2; 5 (4.1), 6 (4.2), 7 (4.5) e 8 (4.8) LPMO clan 4.

A Figura 20 revelou bandas das amostras 2.3 e 2.5 próximas à banda de 30 kDa do marcador de peso molecular (indicado por L na Figura 20), o que representa forte indício de que se trata da proteína LPMO clan 3_2 (2), cuja peso molecular, como evidenciado pela Tabela 5, é de 36,6 kDa. Não foi constatada, todavia, qualquer outra banda que coincidissem com a peso molecular das outras amostras, restringindo-se à seleção apenas das amostras 2.3 e 2.5 para a continuidade dos experimentos.

Após a preparação de um estoque das amostras 2.3 e 2.5, foram repetidos os procedimentos de inóculo no meio mínimo sólido com glicose a 1% (m/v), durante 4 dias, e posterior raspagem de uma parcela dos esporos para meio idêntico de maltose para expressão. As placas de Petri com meio sólido foram registradas e apresentadas na Figura 21.

Figura 21 - Placas de Petri referentes aos cultivos das amostras 2.3 e 2.5 em meio sólido.



Fonte: Arquivo próprio.

Após a repetição dos mesmos procedimentos que consistiram na filtração dos meios cultivados e concentração dos extratos enzimáticos, foi novamente utilizada a técnica de Bradford para quantificar as proteínas totais do extrato concentrado (Tabela 10).

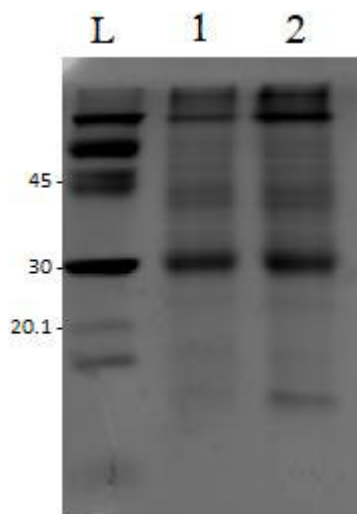
Tabela 10 - Quantificação do teor de proteínas dos extratos 2.3 e 2.5.

<>	Branco	2.3	2.5
1	0,3502	0,5106	0,5483
2	0,3681	0,4647	0,5821
3	0,3660	0,4970	0,5670
AVG	0,3614	0,4908	0,5658
OD	0,0000	0,1293	0,2044
µg	0,0000	0,8599	1,3588
para 10		11,60	7,40

Fonte: Arquivo próprio

A aplicação de 10 µg de proteína para análise em eletroforese DSD-PAGE 15%, que corresponde à quantidade, em µL, indicada na linha “para 10” da Tabela 10, resultou no gel indicado na Figura 22.

Figura 22 - Eletroforese em SDS-PAGE 15% dos extratos 2.3 e 2.5.



Fonte: Arquivo próprio.

Na Figura 22: L, marcador de peso molecular *GeneRuler 1Kb plus*; 1 (2.3) LPMO 3_2; 2 (2.5) LPMO 3_2.

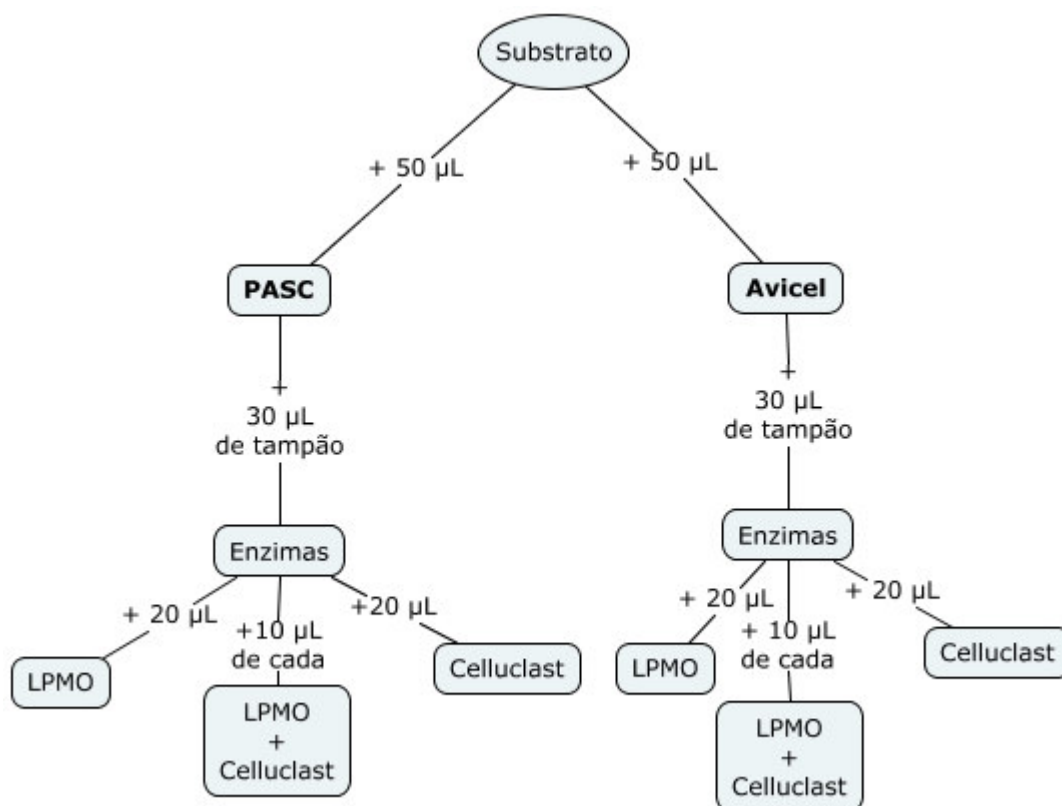
A Figura 22 mostra duas bandas que estão localizadas em posição ligeiramente superior à banda do marcador de 30 kDa. A afirmação de que tais bandas correspondem às proteínas estudadas, isto é, à LPMO clan 3_2, é corroborada pelos dados apresentados na Tabela 5, cujo peso molecular teórico é de cerca de 36,6 kDa.

4.6.4 Atividade enzimática com os substratos Avicel® e PASC

As reações dos extratos enzimáticos com os substratos Avicel® e PASC (*Phosphoric acid swollen cellulose*) a 1 mol/L foram esquematicamente organizadas no fluxograma da Figura 23, que tem por objetivo ilustrar as reações da LPMO clan 3_2 e da enzima comercial Celluclast separadamente. A mistura das duas enzimas tem por finalidade avaliar o efeito sinérgico da LPMO. A preparação do branco contou com a adição de 50 µL de tampão e 50 µL do substrato. Todas as

reações tiveram como volume final 100 μL , além da adição de 100 μL de DNS para apontar o consumo do açúcar redutor e poder quantificá-lo pelo método do DNS.

Figura 23 - Fluxograma dos componentes da mistura reacional para atividade das enzimas LPMO 3_1 e Celluclast comercial.

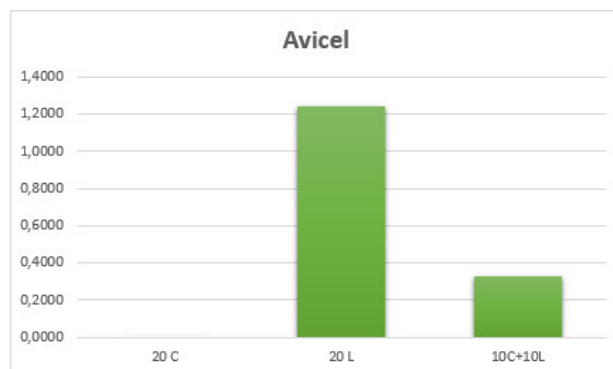


Fonte: Arquivo próprio.

Após a incubação das misturas reacionais junto a 100 μL de DNS, a mistura resultante foi incubada no termociclador a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. Os açúcares redutores formados foram medidos em com o método do DNS, e a leitura efetuada em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados obtidos, de natureza qualitativa, tiveram por objetivo elucidar a questão de haver ou não atividade apreciável da LPMO, isto é, averiguar se a atividade oxidativa gera quantidades significativas de açúcares redutores. Os resultados obtidos foram organizados nas Figuras 24 e 25, separadas de acordo com o substrato utilizado.

Figura 24 - Absorbância das reações com Avicel® pelo método colorimétrico de DNS.

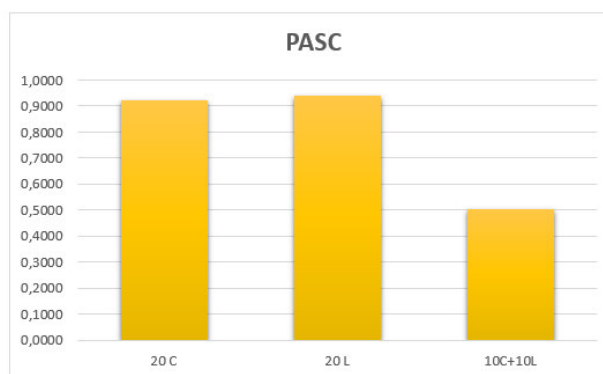
Avicel				
<>	Branco	20 C	20 L	10C+10L
1	0,1297	0,1246	0,3879	0,1897
2	0,1560	0,1623	0,3453	0,2608
3	0,1577	0,1486	0,3227	0,1542
AVG	0,1478	0,1452	0,3520	0,2016
OD	0,0000	0,0000	0,2042	0,0538
ug	0,0000	0,0000	24,8935	6,5556
ug/uL	0,0000	0,0000	1,2447	0,3278



Fonte: Arquivo próprio.

Figura 25 - Absorbância das reações com PASC pelo método colorimétrico de DNS.

PASC				
<>	Branco	20 C	20 L	10C+10L
1	0,0993	0,2434	0,2247	0,1824
2	0,0874	0,2947	0,2647	0,1910
3	0,0860	0,1885	0,2444	0,1467
AVG	0,0909	0,2422	0,2446	0,1734
OD	0,0000	0,1513	0,1537	0,0825
ug	0,0000	18,4476	18,7402	10,0549
ug/uL	0,0000	0,9224	0,9370	0,5027



Fonte: Arquivo próprio.

A diferença observada nas reações com PASC e Avicel® pode ser explicada em termos da diferença de cristalinidade entre os dois substratos. Quando Celluclast comercial foi posta para reagir com celulose microcristalina, comercializada sob a marca Avicel®, não foi observada absorbância pelo método colorimétrico de DNS após leitura no espectrofotômetro, o que pode indicar uma concentração inapropriada de Celluclast. A atividade da mistura contendo a LPMO estudada, por sua vez, foi a maior registrada em ambos os substratos, embora a enzima não estivesse purificada. A utilização de um substrato tratado para reduzir o grau de cristalinidade, como no caso da celulose entumecida com ácido fosfórico (PASC), apresentou resultados quase idênticos quando utilizadas as enzimas previamente citadas. Um resultado comum aos dois substratos é o fato de não se ter observado sinergia entre as duas enzimas, o que não aponta necessariamente para ausência

dela, mas sugere que outros fatores devem ser levados em consideração, como as condições de aerobiose (ausência de agitação), a não presença de um agente redutor e as impurezas associadas à mistura que continha a LPMO (presença de outras enzimas ou açúcares redutores), por exemplo.

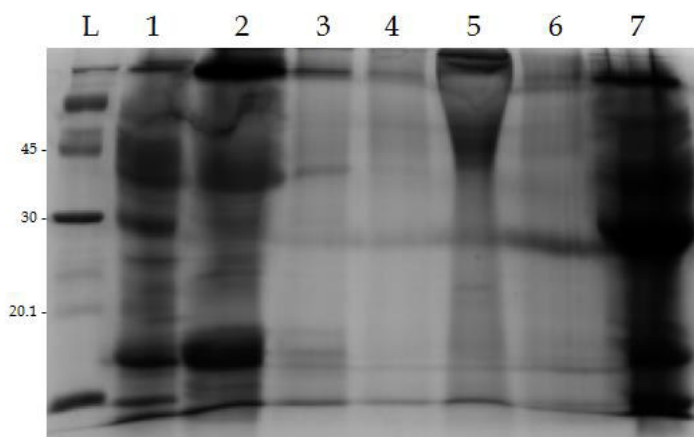
Com base nos estudos desenvolvidos por Müller (2015), é possível concluir que uma das alternativas para estudo da ação sinérgica otimizada das LPMOs com a enzima comercial Celluclast no desenvolvimento de coquetéis para aplicação em biorrefinarias é a utilização de substratos lignocelulósicos. O uso de Celluclast para ação nas regiões amorfas e de LPMOs para as regiões cristalinas, onde a Celluclast não é tão eficiente, com emprego de condições aeróbicas e presença de lignina como um doador externo de elétrons, eliminando a necessidade de um doador externo, tendem a aumentar o rendimento da sacarificação e fornecer dados que permitam avaliar a existência de sinergia entre essas duas enzimas. Adicionalmente, a avaliação de uma metodologia para quantificação da atividade exclusiva da LPMO que não esteja restrita à reação com DNS, que pode não ser precisa considerando a existência de eventuais impurezas que possam levar a uma imprecisão do método.

4.7 Purificação e análise

4.7.1 Purificação por troca iônica em coluna de bancada e análise

Concluída a primeira etapa de purificação, por troca iônica, cada fração coletada da coluna de bancada, isto é, para as 6 frações eluídas em diferentes concentrações de NaCl mais o flow through, foi submetida à concentração em Vivaspin® 6 MWCO 5000, totalizando, aproximadamente, um volume final de 1 mL para cada amostra. Após a concentração, as amostras foram submetidas à análise em eletroforese SDS-PAGE 15%. O resultado é relativo à amostra 2.3 e é apresentado na Figura 26.

Figura 26 - Eletroforese em SDS-PAGE 15% de cada fração eluída em diferentes concentrações de NaCl e flow through.



Fonte: Arquivo próprio.

Da Figura 26: L, marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb plus; 1, fração de 100 mmol/L; 2, fração de 200 mmol/L; 3, fração de 300 mmol/L; 4, fração de 400 mmol/L; 5, fração de 500 mmol/L; 6, fração de 1 mol/L; 7, *flow through*.

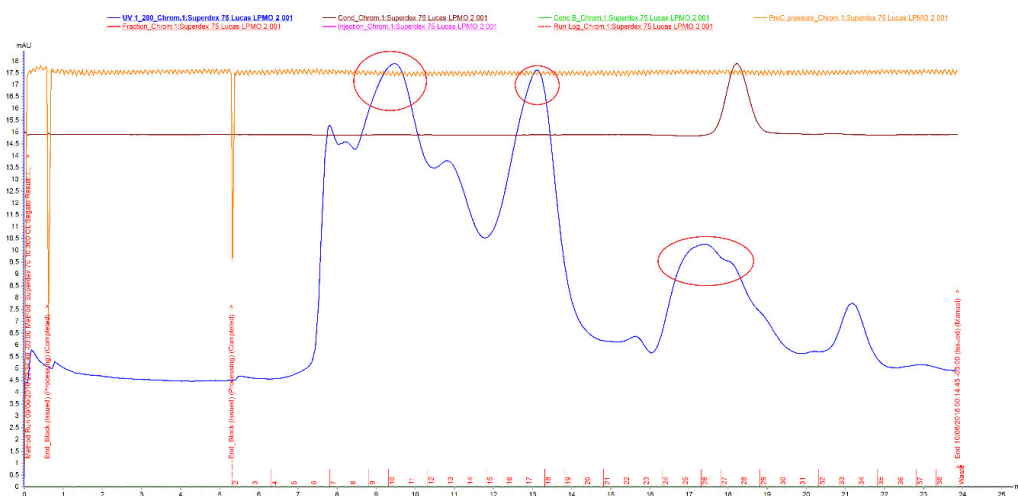
A partir da Figura 26, pode-se depreender que a LPMO 3_2, da amostra 2.3, apareceu no *flow through* e, em menor quantidade, na fração de 100 mmol/L. A proteína fortemente expressa no domínio de 30 kDa, tendo peso molecular teórico de 36,6 kDa, aponta para a sua seleção que conduz às subsequentes etapas de purificação, uma vez que a tentativa de purificação pelo mecanismo de troca iônica, utilizando uma coluna de bancada junto à resina DEAE, não foi possível. A distorção observada na Figura 26, responsável por aparentar certo afastamento da banda presente na lane 7 em relação ao peso molecular teórico da proteína estudada, pode ser justificada pela presença de sais de NaCl, o que pode ser corrigido pela diálise das amostras analisadas, utilizando tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L.

4.7.2 Purificação por exclusão de tamanho e análise

A primeira tentativa de purificação por exclusão de tamanho, ou gel-filtração, consistiu na utilização do sistema *Äkta Purifier* (GE Healthcare), com o qual foram gerados quatro cromatogramas, correspondentes às quatro injeções de, aproximadamente, 5 mL cada, em que foram obtidas a Figura 27 e a Figura 28. A Figura 27 corresponde ao cromatograma em que as

amostras submetidas à purificação, isto é, alíquotas provenientes do *flow through*, não haviam sido concentradas, ao passo que o cromatograma apresentado na Figura 28 se refere ao cenário pós-concentração, em que houve aumento da carga proteica nas amostras.

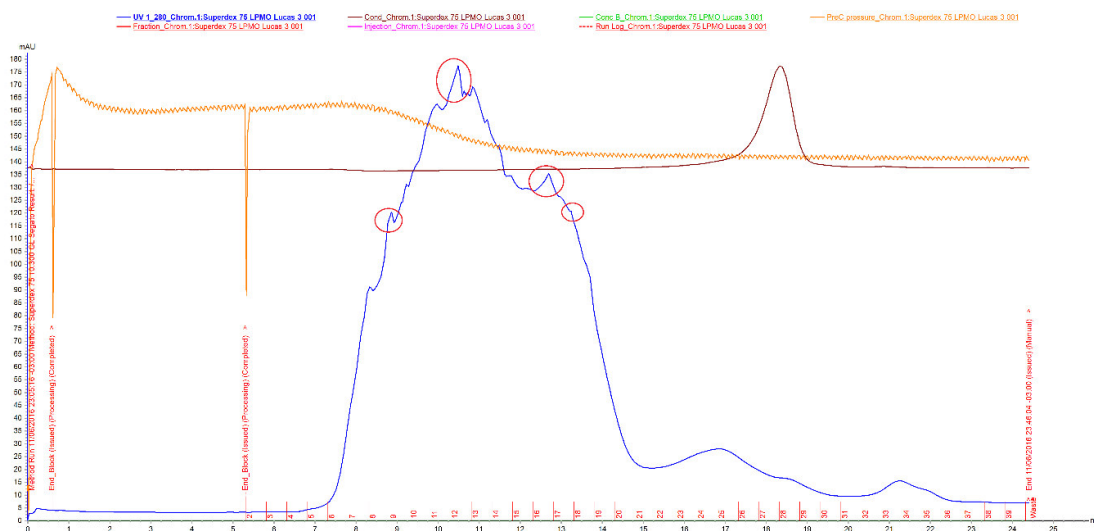
Figura 27 - Cromatograma relativo à injeção 2 da amostra não concentrada.



Fonte: Arquivo próprio.

Da Figura 27: A linha azul representa a absorbância durante a coleta das frações indicadas em vermelho, na parte inferior da imagem. As frações 10.2, 17.2 e 26.2 foram selecionadas para análise em eletroforese SDS-PAGE.

Figura 28 - Cromatograma relativo à injeção 3 da amostra concentrada.



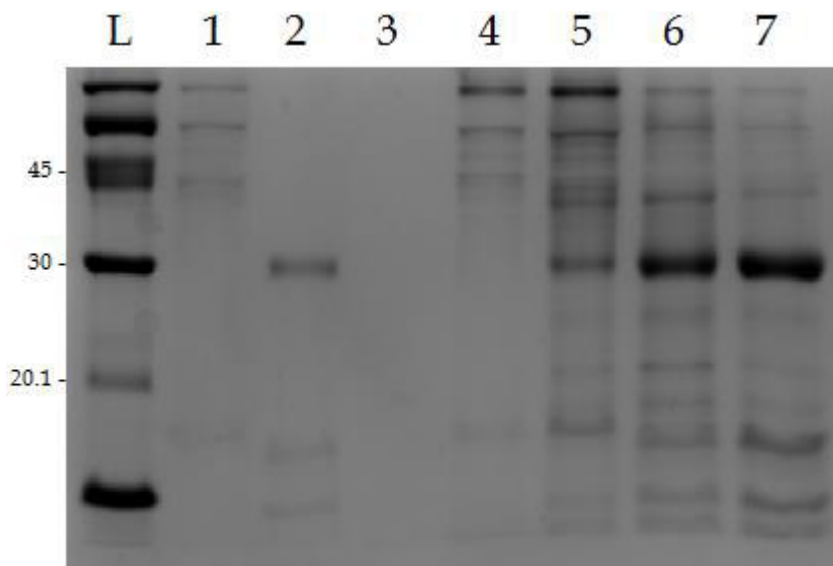
Fonte: Arquivo próprio.

Na Figura 28, a linha azul representa a absorbância durante a coleta das frações indicadas em vermelho, na parte inferior da imagem. As frações 9.3, 12.3, 16.3 e 18.3 foram selecionadas para análise em eletroforese SDS-PAGE.

As Figuras 27 e 28 referem-se às injeções 2 e 3, respectivamente. Devido à grande similaridade entre os cromatogramas relativos às amostras 1 e 2, e 3 e 4, apenas os cromatogramas utilizados para a seleção das amostras que foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE foram apresentados.

Para primeira análise em eletroforese SDS-PAGE 15% foram selecionadas amostras correspondentes às segunda (pré-concentração) e terceira (pós-concentração) injeções. A Figura 29 apresenta o resultado obtido, cujas frações coletadas são identificadas pelo seu número seguido da injeção correspondente, por exemplo, 10.2 representa a fração 10 da segunda injeção, ao passo que 9.3 representa a fração 9 da terceira injeção.

Figura 29 - Análise do gel pós-purificação que correspondem às injeções 2 e 3.



Fonte: Arquivo próprio.

Na Figura 29: L, marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb plus; 1, fração 10.2; 2, fração 17.2; 3, fração 26.2; 4, fração 9.3; 5, fração 12.3; 6, fração 16.3; 7, fração 18.3.

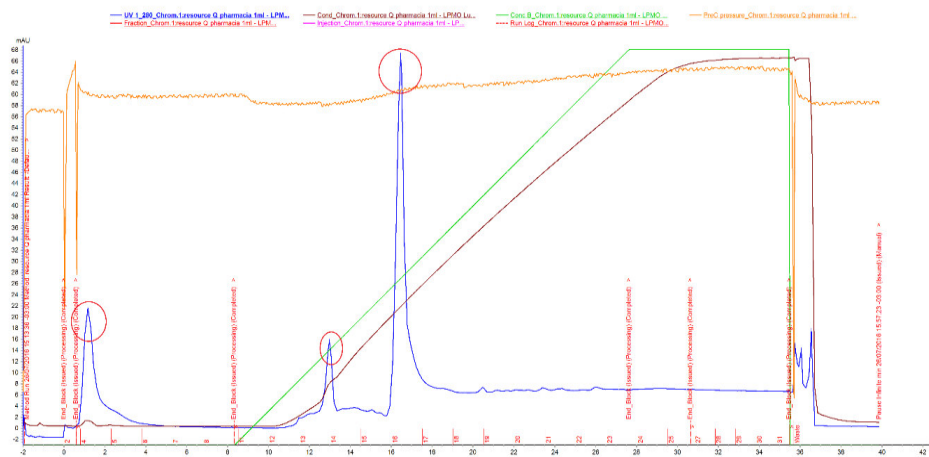
A Figura 29 ilustra o caso em que não foi possível obter a purificação das amostras de *flow through* pela técnica de exclusão de tamanho. As lanes apresentadas na figura acima contêm traços de outras proteínas, de diferentes pesos moleculares, o que se traduz na ineficiência dessa técnica de purificação como método de isolamento da LPMO. A ineficiência da técnica demanda a investigação de outras estratégias de purificação, a fim de se obter o isolamento da proteína de interesse. Todavia, é possível concluir pela análise da figura acima que as frações 17.2, 16.3 e 18.3 apresentam a banda que corresponde à LPMO 3_2, de 36,6 kDa, o que possibilitou juntar as amostras correspondentes e prosseguir com os experimentos, aventando uma outra técnica de purificação.

4.7.3 Purificação por troca iônica em coluna de 1 mL e análise

A tentativa de purificação por troca iônica utilizando a coluna Resource Q de 1 mL resultou nos cromatogramas apresentados nas Figuras 30 e 31. Nesta etapa, foram selecionadas as frações

que apresentaram a proteína estudada, de acordo com a Figura 30. Essas frações correspondem aos números 2 (fração 17.2), 6 (fração 16.3) e 7 (fração 18.3).

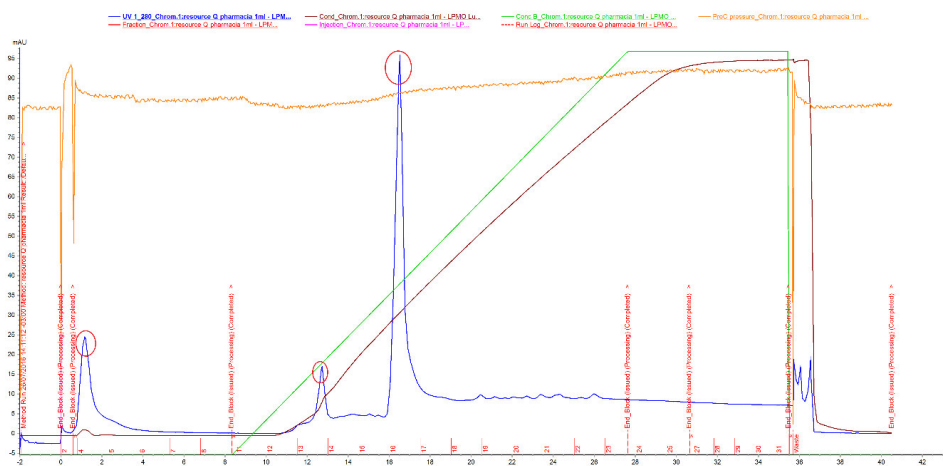
Figura 30 - Cromatograma relativo à injeção 5 contendo as amostras 17.2, 16.3 e 18.3.



Fonte: Arquivo próprio.

A linha azul representa a absorbância durante a coleta das frações indicadas em vermelho, na parte inferior da imagem. A linha em verde corresponde ao aumento progressivo da concentração de NaCl. As frações 4, 13, 14 e 16 foram selecionadas para análise em eletroforese SDS-PAGE.

Figura 31 - Cromatograma relativo à injeção 6 contendo as amostras 17.2, 16.3 e 18.3.

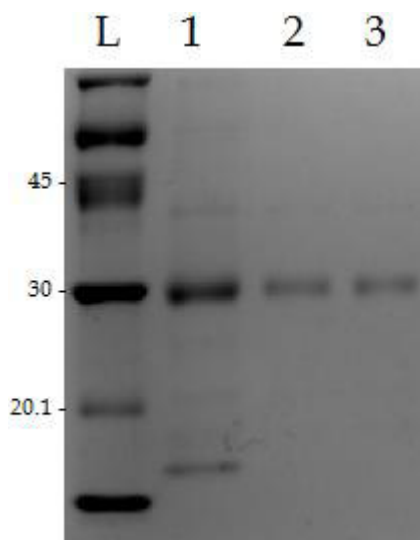


Fonte: Arquivo próprio.

A linha azul representa a absorbância durante a coleta das frações indicadas em vermelho, na parte inferior da imagem. A linha em verde corresponde ao aumento progressivo da concentração de NaCl. As frações 4, 13 e 16 foram selecionadas para análise em eletroforese SDS-PAGE.

A análise dos cromatogramas da Figuras 30 e 31 possibilitou a seleção de algumas frações, baseada na absorbância de cada uma delas. A fração representada pelo número 4 nos cromatogramas corresponde à fração eluída que não se ligou à coluna, o que pode ser corroborado pela linha verde do cromatograma, em que a concentração salina está em 0%. Aquelas frações que apresentaram pico, resultando em absorbâncias mais elevadas, o que pode ser indício da proteína estudada, foram coletadas. Tais frações foram analisadas em SDS-PAGE, que resultou na Figura 32. No entanto, apenas as frações que apresentaram bandas foram representadas, o que, coincidentemente, correspondem à LPMO 3_2.

Figura 32 - Eletroforese em SDS-PAGE das frações coletadas, correspondente às injeções 5 e 6.



Fonte: Arquivo próprio.

Na Figura 32: L, marcador de peso molecular *GeneRuler 1Kb plus*; 1, amostra inicial contendo as frações 17.2, 16.3 e 18.3 para fins comparativos; 2, fração 4.5; 3, fração 4.6.

Pode-se depreender da Figura 32 que, embora a tentativa de purificação tenha sido mais eficiente, ainda não foi possível isolar a LPMO 3_1, uma vez que as lanes 2 e 3 apresentam resquícios de proteínas que se aproximam do peso molecular de 45 kDa. Os resultados obtidos após

essa tentativa apontaram para a não purificação da amostra, utilizada nas injeções 5 e 6. Devido ao ponto isoelétrico (pI) da proteína ser 5,51, aventa-se a possibilidade de aumentar o pH das soluções tampão para 7,5 para tentar uma nova purificação pelo mecanismo de troca iônica utilizando a coluna Resource Q de 1 mL novamente.

5 CONCLUSÕES

Eletroforese em gel de agarose 1% apontou a amplificação bem-sucedida dos seis genes estudados. Como vetor para clonagem em *A. nidulans* linhagem A773 utilizou-se pEXPYR, que obteve sucesso em três das cinco amostras pretendidas de amplificação, por meio do emprego da enzima *Phusion*® DNA polimerase. A aplicação do sistema de Clonagem Independente de Ligase (LIC) a partir de um inserto, isto é, dos genes previamente amplificados, e de um vetor de clonagem (pEXPYR) permitiu posterior emprego do vetor na transformação em *E. coli*. A propagação dos genes em *E. coli* garantiu quantidade satisfatória de colônias para a realização de PCR, obtendo, todavia, bandas pouco expressivas, que após a preparação de solução estoque, miniprep e PCR resultaram na amplificação expressiva de dois dos seis genes pretendidos. A transformação em *A. nidulans* ocorreu a partir da seleção dos dois genes amplificados, sendo possível realizar um teste preliminar, em escala reduzida, de atividade dos extratos enzimáticos nos substratos PASC e Avicel®, na qual não foi observada sinergia apreciável entre as enzimas. Fatores como ausência de um agente redutor e de aeração, concentração de Celluclast e método de quantificação de atividade de LPMO podem influenciado nos resultados obtidos. Em escala ampliada, foi possível efetuar sucessivas tentativas de purificação da LPMO selecionada. No entanto, não foi possível iniciar os testes de atividade com a enzima purificada.

Do ponto de vista de aplicação industrial voltada a biorrefinarias, foi possível sugerir, para continuação dos experimentos conduzidos em laboratório, uma via alternativa a partir do emprego de materiais lignocelulósicos como substrato. À luz da literatura utilizada, pode-se analisar a influência de diferentes fatores como o pré-tratamento, teor de sólidos, presença ou ausência de oxigênio, doador externo de elétrons e tempo de incubação no processo de sacarificação de diferentes substratos.

REFERÊNCIAS

- AGGER, J. W. et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 17, p. 6287–6292, 2014.
- ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic acids research**, v. 18, n. 20, p. 6069–6074, 1990.
- BEESEON, W. T. et al. Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. **Annual Review of Biochemistry**, 2015.
- BENNATI-GRANIER, C. et al. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, p. 90, 2015.
- BERKA, R. M. et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922–927, 2011.
- BOOK, A. J. et al. Evolution of substrate specificity in bacterial AA10 lytic polysaccharide monooxygenases. **Biotechnology for Biofuels**, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976.
- CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). **Protein Expression and Purification**, v. 99, p. 35–42, 2014.
- COONEY, D. G.; EMERSON, R. Thermophilic Fungi. An Account of their Biology, Activities, and Classification. **Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie**, v. 6, n. 2, p. 137, 1966.
- DORTAY, H. et al. High-throughput protein expression using a combination of ligation-independent cloning (LIC) and infrared fluorescent protein (IFP) detection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.
- EIBINGER, M. et al. Single-molecule study of oxidative enzymatic deconstruction of cellulose. **Nature Communications**, 2017.
- ESCAMILLA-ALVARADO, C. et al. An overview of the enzyme potential in bioenergy-producing biorefineries **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2017.
- FLOUDAS, D. et al. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, 2012.

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. 1, p. 101, 2015.

GEERLOF, A. Improving the solubility of expressed proteins. **Gene**, 2006.

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**, 2010.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, 1997.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5813, p. 804–7, 2007.

HU, J. et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy and Environmental Science**, 2014.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. **Gene**, 1990.

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.

JOHANSEN, K. S. Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide monooxygenases. **Biochemical Society Transactions**, 2016.

KIS-PAPO, T. et al. Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. **Microbial Ecology**, 2003.

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**, 1989.

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.

LI, X. et al. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. **Structure**, v. 20, n. 6, p. 1051–1061, 2012.

LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing Aspergillus as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 53–75, jan. 2009.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 461–88, 2000.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 1959.

MORGENSTERN, I. et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**, v. 116, n. 4, p. 489–502, 2012.

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

NEVALAINEN, K. M. H.; TE'O, V. S. J.; BERGQUIST, P. L. **Heterologous protein expression in filamentous fungi** *Trends in Biotechnology*, 2005.

OAKLEY, B. R. *Aspergillus nidulans*. In: **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 212–215.

PUNT, P. J. et al. **Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production** *Trends in Biotechnology*, 2002.

PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. [39] Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. **Methods in Enzymology**, v. 216, p. 447–457, 1992.

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. 15079–84, 2011.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Lignocellulose pretreatment technologies affect the level of enzymatic cellulose oxidation by LPMO. **Green Chemistry**, 2015.

SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 2012.

STEPHANOPOULOS, G. Synthetic biology and metabolic engineering. **ACS Synthetic Biology**, 2012.

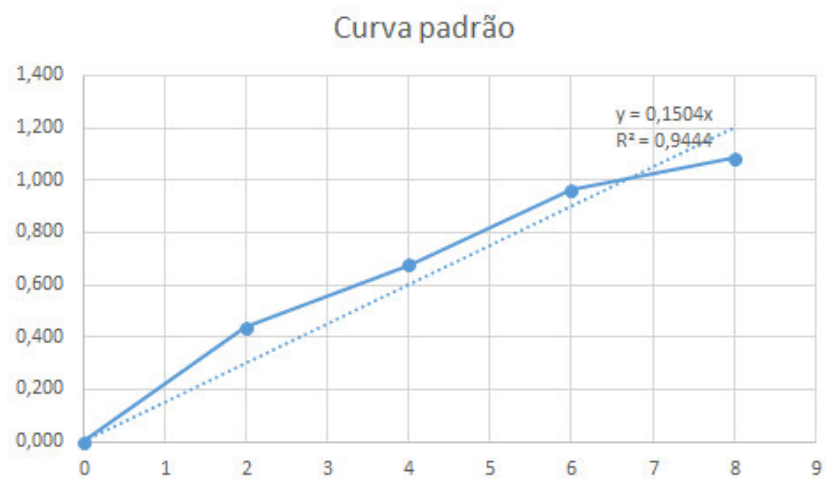
TAYLOR, C. B. et al. Binding site dynamics and aromatic-carbohydrate interactions in processive and non-processive family 7 glycoside hydrolases. **Journal of Physical Chemistry B**, 2013.

TILBURN, J. et al. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, 1983.

TIMBERLAKE, W. E. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, 1980. VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, 2010.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems** *Biotechnology and Bioengineering*, 2004.

APÊNDICE A - Curva padrão para determinação de proteínas totais pelo método de Bradford



O eixo da ordenadas (y) é indicativo dos valores de absorbância, enquanto o eixo das abscissas (x) refere-se à massa, em μg .