



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

MÁRCIO WALUCE PINHEIRO ROCHA DE SANTANA

**PRODUÇÃO DE MONOXIGENASE LÍTICA DE
POLISSACARÍDEO EM *KOMAGATAELLA PHAFFII*
COMO ADITIVO A COQUETEL DE CELULASES
APLICADO EM PROCESSO DE HIDRÓLISE
ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Vitória da Conquista, BA

2018

MÁRCIO WALUCE PINHEIRO ROCHA DE SANTANA

**PRODUÇÃO DE MONOXIGENASE LÍTICA DE
POLISSACARÍDEO EM *KOMAGATAELLA PHAFFII*
COMO ADITIVO A COQUETEL DE CELULASES
APLICADO EM PROCESSO DE HIDRÓLISE
ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira,
Universidade Federal da Bahia – UFBA
Embrapa Agroenergia - DF

Coorientadoras: Mônica Caramz Triches Damaso e Léia
Cecília de Lima Fávaro, Dras.
Embrapa Agroenergia – DF

Vitória da Conquista, BA

2018

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Santana, Márcio Waluce Pinheiro Rocha de

Produção da mono-oxigenase lítica de polissacarídeo de *Trichoderma reesei* (TrCel61A) por *Komagataella phaffii* e seu efeito na hidrólise enzimática de biomassa pré-tratada / Márcio Waluce Pinheiro Rocha de Santana .- 2018.

70 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira.

Coorientadoras: Profª. Dra. Mônica Caraméz Triches Damaso, Profª. Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2018.

1. Enzimas auxiliares. 2. Hidrólise. 3. Komagataella phaffii. I. Universidade Federal da Bahia. II. Instituto Multidisciplinar em Saúde. III. Siqueira, Félix Gonçalves de. IV. Damaso, Mônica Caraméz Triches. V. Fávaro, Léia Cecília de Lima. VI. Título

CDU: 604.4:662.6:579

Márcio Waluce Pinheiro Rocha de Santana

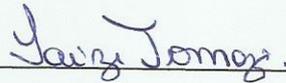
**PRODUÇÃO DE MONOXIGENASES LÍTICAS DE
POLISSACARÍDEOS EM *KOMAGATAELLA PHAFFII* COMO
ADITIVO A COQUETEL DE CELULASES APLICADO EM
PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE
CANA- DE AÇUCAR Vitória da Conquista – BA,**

03/04/2018.



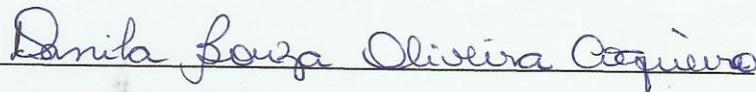
PROF. DR. FÉLIX GONÇALVES DE SIQUEIRA (ORIENTADOR)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA



PROF. DR^a. LAIZE TOMAZI (EXAMINADORA)

UNIVERSIDADE FEDEDERAL DA BAHIA



PROF^a. DR^a. DANILA SOUZA OLIVEIRA COQUEIRO (EXAMINADORA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Dedico essa dissertação à minha mãe pelo apoio e suporte durante o desenvolvimento da mesma. Aos amigos, fiéis companheiros que me apoiaram e incentivaram constantemente.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças nos momentos mais difíceis, permitindo que eu superasse todas as dificuldades.

À minha mãe que, com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao corpo docente pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade.

Aos colegas de trabalho, em especial à Fernanda Pinheiro dos Santos, à Kelly Barreto Rodrigues e ao Rubén Romero, por toda ajuda prestada durante os experimentos e parte escrita desta dissertação.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas.

Ao Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

À Embrapa (Projeto Upzyme) pelo auxílio financeiro concedido na forma de estágio de pós-graduação.

Para o cristianismo, o judaísmo, o islamismo e todas as tradições espirituais do mundo, cada vida humana tem um propósito, um sentido, que permanece amplamente invisível às pessoas em torno, que para o próprio indivíduo só se revela aos poucos, e que só se esclarecerá por completo quando essa vida, uma vez encerrada, puder ser medida na escala da suprema perfeição, da suprema sabedoria, da suprema santidade (DE CARVALHO, 2013).

RESUMO

Alguns estudos têm dado um maior enfoque no aproveitamento de resíduos agroindustriais e coprodutos, como o aproveitamento da celulose e hemicelulose, que compõem a parede celular vegetal de materiais lignocelulósicos (ou biomassas lignocelulósicas), para produção de etanol de segunda geração (E2G) e outros bioprodutos. Diversas enzimas provenientes de fungos e bactérias atuam na desconstrução desses polissacarídeos em monossacarídeos, possibilitando assim a posterior fermentação alcoólica. As enzimas celulasas e hemicelulasas já têm sido bem estudadas, porém, na última década, novas enzimas com atividade oxidativa, tais como as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs do inglês *Lytic polysaccharide monoxygenases*), que aumentam a liberação de glicose conjuntamente com as celulasas e hemicelulasas têm despertado grande atenção da comunidade científica. Para a caracterização de novas LPMOs, faz-se necessária a inserção de genes codificadores dessas enzimas em sistemas de expressão, como por exemplo, de *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*). A LPMO TrCel61A de *Trichoderma reesei* (*T. reesei*), pertencente à família AA9, foi previamente caracterizada e no presente trabalho ela foi utilizada como modelo, juntamente com cinco novas LPMOs provenientes de Basidiomycota e Ascomycota, as quais foram selecionadas do banco de dados CAZy, sintetizadas, clonadas em vetor de expressão pPICZ α A e então transformadas em *K. phaffii*. Embora nenhuma das cinco novas enzimas tenham sido produzidas por *K. phaffii*, a LPMO modelo TrCel61A foi produzida com sucesso. O trabalho prosseguiu com a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise, utilizando os extratos brutos enzimáticos do fungo mutante hipercelulolítico *Trichoderma reesei* RUT-C30 e da linhagem padrão *Aspergillus aculeatus* F-50. Com base nos resultados de hidrólise enzimática, foi possível observar que com a adição da LPMO TrCel61A houve aumento significativo da liberação de glicose, conseguindo superar a liberação ocorrida com a enzima comercial *celluloclast*. De fato, a adição de LPMO-TrCel61A na mistura enzimática ideal aumenta a conversão de celulose até 18,35%. Estes dados indicaram que TrCel61A tem um efeito positivo maior na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, aumentando a conversão bioquímica de extratos celulolíticos de *T. reesei* e *A. aculeatus* quando adicionada como enzima acessória em misturas enzimáticas ideais.

Palavras-chave: LPMO. *Komagataella phaffii*. Enzimas auxiliares. Hidrólise enzimática. Glicose.

ABSTRACT

Several studies have focused on the use of agro-industrial residues and co-products, such as the use of cellulose and hemicellulose, which is component of the plant cell wall of lignocellulosic biomass for the production of second generation ethanol (2G) and other bioproducts. Several enzymes derived from fungi and bacteria act in the deconstruction of these polysaccharides in monosaccharides, thus allowing subsequent alcoholic fermentation. The enzymes cellulases and hemicellulases have already been well studied, but in the last decade, new enzymes with oxidative activity, such as lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs), which increase the release of glucose together with the cellulases and hemicellulases have attracted attention of the scientific community. For the characterization of new LPMOs, it is necessary to insert genes encoding these enzymes in expression systems, such as, for example, *Komagataella phaffii*. The LPMO TrCel61A from *Trichoderma reesei*, belonging to the AA9 family, was previously characterized and in the present work it was used as a model, together with five new LPMOs from Basidiomycota and Ascomycota, which were selected from the CAZy database, synthesized, cloned into expression vector pPICZ α A and then transformed into *K. phaffii*. Although none of the five new enzymes were successfully produced by *K. phaffii*, but the LPMO model TrCel61A was produced. The work continued with the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis using the enzymatic crude extracts of the mutant hyperchololytic fungus *Trichoderma reesei* RUT-C30 and the standard lineage *Aspergillus aculeatus* F-50. Based on the results of enzymatic hydrolysis, it was possible to observe that with the addition of LPMO TrCel61A there was a significant increase in the glucose release, being able to overcome the release occurred with the commercial enzyme celluloclast. In fact, the addition of LPMO-TrCel61A in the optimum enzyme mix increases the cellulose conversion to 18.35%. These data indicate that TrCel61A has a greater positive effect on the hydrolysis of sugarcane bagasse, increasing the biochemical conversion of cellulolytic extracts of *T. reesei* and *A. aculeatus* when added as accessory enzyme in ideal enzymatic mixtures.

Key words: LPMO. *Komagataella phaffii*. Enzymes, Enzymatic hydrolysis. Glucose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Organização da parede celular vegetal (adaptado de KUBICEK, 2012).....	15
Figura 2. Estrutura da celulose. A celulose é um polímero formado por monômeros de β -D-glicose unidos por ligações covalentes do tipo β -1,4. As celuloses são firmemente ligadas entre si por pontes de hidrogênio, tanto por ligações intramoleculares (A), quanto por ligações intermoleculares (B), formando então o polímero de celulose. Fonte: adaptado de Kubicek (2012).....	16
Figura 3. Esquema adaptado do efeito do pré-tratamento sobre a lignocelulose. Fonte: adaptado de Wang <i>et al.</i> (2017).....	18
Figura 4. Reação oxidativa da LPMO nos carbonos C1 e C4. Fonte: adaptado de Hemsworth <i>et al.</i> (2015).....	21
Figura 5. Esquemas das ações sinérgicas de enzimas fúngicas degradadoras da parede celular vegetal (celulases, hemicelulases, LPMOs). Fonte: adaptado de Dutta e Wu (2014).....	22
Figura 6 Diferentes rotas de ação das LPMOs fúngicas (basidiomicetos). Rota a) rota oxidativa da LPMO via cofator de cobre artificial como ácido gálico e ascórbico; Rota b) rota oxidativa da LPMO via GDH; Rota c) ação redox via degradação da lignina via enzimas fúngicas; rota d) radicais fenólicos derivados da lignina; Rota e) ativação via pigmentos fotossintéticos. Fonte: adaptado de Martinez <i>et al.</i> (2017)	23
Figura 7 Ilustrações da estrutura da superfície (esquerda) e do sítio ativo de cobre (direita) da LPMO AA9 do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (Fushinobu, 2014).....	24
Figura 8 - Mapa do vetor pPICZ α A.....	28
Figura 9. Representação esquemática do processo de clonagem e indução dos genes de LPMOs selecionados.....	29
Figura 10. Diagrama ternário com as novas regiões de busca após as restrições no planejamento experimental.	53
Figura 11. Análise por SDS-PAGE e Western Blot do sobrenadante e da proteína purificada TrCel61A após 96 horas de indução em <i>K. phaffii</i> . A) Sobrenadante da indução após 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo (linhas 1 a 4) 4); B) Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo Anti-HisTag. As amostras estão na mesma ordem que (A). M - PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific). C) Proteína TrCel61A após a purificação por coluna de afinidade HisTag (linha 2). A linha 1 mostra o sobrenadante após ser passado pela coluna (flow-through). As setas indicam a proteína alvo. M) <i>Color Prestained Protein Standard</i> (New England Biolabs®)	55
Figura 12. Atividades de FPase (celulases totais), β -glicosidase e xilanase dos extratos brutos obtidos na fermentação submersa de <i>T. reesei</i> ATCC® 60787 e <i>A. aculeatus</i> F-50.	56

Figura 13. Concentração de glicose após hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar usando concentração ótima de enzima (TR + AA) e enzima acessória LPMO-TrCel61A. Legenda: LPMO+TRAA: *T. reesei/A. aculeatus* com extrato de LPMO-TrCel61A; TRAA-LMPO: *T. reesei/A. aculeatus* sem extrato de LPMO-TrCel61A; LPMO: Adicionando apenas LPMO-TrCel61A.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparação de gel de agarose 1%.....	31
Tabela 2 Meio de cultura utilizado para crescimentos dos fungos filamentos selecionados para produção de celulases totais (FPase) e β -glicosidase.	37
Tabela 3. Curva analítica de glicose – Beta-glicosidase	38
Tabela 4. Curva analítica de glicose – Fpase.....	39
Tabela 5. Matriz de planejamento de mistura para <i>simplex lattice</i> e efeito quadrático, inseridas as restrições, para hidrólise enzimática de biomassas vegetais com misturas de extratos fúngicos.....	40
Tabela 6. Matriz de misturas de extratos brutos enzimáticos e concentração de glicose após hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise. <i>T. reesei</i> (TR); <i>A. aculeatus</i> (AA); LPMO (LPMO-TrCel61A).....	57
Tabela 7 Glicose gerada das hidrólises conduzidas por até 48 horas no bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise. Hidrólise 1 (Com/LPMO); Hidrólise 2 (Sem/LPMO); Hidrólise 3 (comercial Celluloclast®); Hidrólise 4 (comercial Cellic® Ctec2); Hidrólise 4 (comercial Cellic® Ctec3). As diferenças estatísticas foram realizadas entre as diferentes hidrólises na mesma coluna (representado pelas letras minúsculas) e para os tempos diferentes na mesma hidrólise (representada pelas letras maiúsculas). Letras diferentes possuem diferença estatística no teste ANOVA.....	59

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Etanol de segunda geração	14
2.2	Estrutura da parede celular dos vegetais	15
2.3	Pré-tratamento da biomassa vegetal	17
2.4	Enzimas envolvidas na desconstrução da biomassa vegetal	18
2.4.1	Fungos de podridão branca	20
2.4.2	Fungos de podridão parda	20
2.4.3	Fungos de podridão branda	20
2.4.4	Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, em inglês)	21
2.5	LPMOs: Expressão heteróloga em <i>Komagataella phaffii</i>	24
3	JUSTIFICATIVA	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	Objetivo geral	27
4.2	Objetivos específicos	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	Seleção e síntese de genes candidatos	28
5.2	Preparação de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	29
5.3	Transformação de <i>E. coli</i> com o vetor pPICZ α A contendo os genes de LPMOs de fungos	31
5.4	Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	31
5.5	Transformação de <i>K. phaffii</i> com os plasmídeos recombinantes (pPICZ α A) contendo as LPMOs de fungos	32
5.5.1	Preparação dos plasmídeos	32
5.5.2	Preparação de células eletrocompetentes de <i>K. phaffii</i>	32
5.5.3	Transformação de <i>K. phaffii</i>	33
5.5.4	Seleção de transformantes de <i>K. phaffii</i> por PCR	34
5.6	Cultivo dos transformantes de <i>K. phaffii</i> e análise da produção de proteína heteróloga	35
5.7	Análise das proteínas secretadas por <i>K. phaffii</i> por SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	35
5.8	Purificação da proteína heteróloga produzida por <i>K. phaffii</i>	35
5.9	Hidrólise enzimática de biomassa vegetal	36
5.9.1	Pré-tratamento da biomassa vegetal – bagaço de cana-de-açúcar	36
5.9.2	Escolha dos fungos para a hidrólise enzimática	36

5.9.3	Extratos brutos enzimáticos e atividades enzimáticas	37
5.9.4	Atividade de β -glicosidase	37
5.9.5	Atividade FPase	38
5.9.6	Planejamento experimental da hidrólise enzimática	39
5.9.7	Validação do planejamento experimental	41
5.9.8	Cinética de hidrólise enzimática	41
6	REFERÊNCIAS	42
7	PRODUÇÃO DE MONO-OXIGENASE LÍTICA DE POLISSACARÍDEO DE <i>TRICHODERMA REESEI</i> (TRCEL61A) POR <i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i> E SEU EFEITO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA PRÉ-TRATADA	47
7.1	Introdução	48
7.2	Material e métodos	49
7.2.1	Seleção e síntese de LPMO de <i>Trichoderma reesei</i>	49
7.2.2	Clonagem e expressão da LPMO de <i>Trichoderma reesei</i> (TrCel61A)	50
7.2.3	Análise da produção e purificação da LPMO TrCel61A	50
7.2.4	Biomassa vegetal	51
7.2.5	Fungos e hidrólise enzimática	51
7.2.6	Extratos brutos enzimáticos e atividades enzimáticas	51
7.2.7	Planejamento experimental	52
7.2.8	Cinética enzimática na hidrólise	54
7.3	Resultados e discussão	54
7.3.1	Clonagem, expressão e purificação da proteína TrCel61A	54
7.3.2	Atividade enzimática dos extratos brutos do <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus aculeatus</i> .	55
7.3.3	Combinações de enzimas (extratos brutos) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.	56
7.3.4	Perfil de hidrólise enzimática	59
7.4	Conclusões	60
7.5	Referências	62
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

1 INTRODUÇÃO

À medida que tem aumentado o consumo de fontes energéticas no mundo, há uma crescente preocupação com os combustíveis fósseis, uma vez que é uma fonte de energia não renovável. Com isso, fontes de energia renováveis têm sido buscadas para complementar os combustíveis fósseis, acrescido do desafio de se produzir um combustível sustentável e barato ao mesmo tempo.

Diversas pesquisas têm voltado a atenção para o melhor aproveitamento na produção de biocombustíveis, com isso reduzir-se-ia a competição com a cadeia alimentícia. As pesquisas têm voltado a sua atenção para a produção de biocombustíveis, tais como etanol de segunda geração (E2G). Para produção de E2G pode-se utilizar matéria-prima proveniente das biomassas vegetais de processos agroindustriais ou mesmo dos coprodutos lignocelulósicos gerados na produção do etanol de primeira geração (E1G) (MUKTHAM *et al.*, 2016). Porém, para aproveitar polímeros e açúcares simples e permitir a fermentação alcoólica, é necessário superar a recalitrância da parede celular (HIMMEL *et al.*, 2007; BENNATI-GRANIER *et al.*, 2015).

As celulasas (exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidases) e as hemicelulasas são as principais enzimas extracelulares de microrganismos utilizadas na desconstrução da lignocelulose; atuando na hidrólise da ligação glicosídica (MAEDA *et al.*, 2013). Na última década, tem sido reportada a descoberta, em fungos e bactérias, de enzimas auxiliares com atividade oxidativa na desconstrução da biomassa vegetal, como mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (do inglês, LPMOs) (ISAKSEN *et al.*, 2014).

Existe uma grande diversidade catabólica entre os microrganismos que produzem enzimas para reduzir os polissacarídeos em moléculas menores para que consigam aproveitar como fonte nutritiva. Essas enzimas têm sido caracterizadas ao longo do tempo e muitas delas possuem grande potencial para uso em indústrias que fazem uso de biomassas vegetais como matéria-prima para obtenção de biomoléculas, tais como glicose e pentoses, para uso em bioprocessos fermentativos, para obtenção de bioprodutos, como etanol, xilitol, dentre outros.

As enzimas extracelulares degradadoras de parede celular vegetal podem ser utilizadas purificadas ou sob a forma de extratos brutos; podendo ser oriundas de microrganismos selvagens ou modificados geneticamente. Os microrganismos podem ser a fonte direta das enzimas, ou também, fontes de informações de sequências gênicas para transformação de microrganismos modelos, tais como bactérias (*Escherichia coli*)

ou leveduras (*Komagataella phaffii*), com o objetivo de obter a enzima purificada para que possa ser caracterizada, ou também para facilitar as etapas de escalonamento da produção da enzima de interesse (LYND *et al.*, 2002; DALY;HEARN, 2005).

As LPMOs são enzimas produzidas por fungos e bactérias e são consideradas como auxiliares ao sistema de degradação da holocelulose (celulose e hemicelulose) (SONG *et al.*, 2018). Estas enzimas normalmente são expressas em baixas concentrações nos seus hospedeiros nativos (fungos ou bactérias), assim o uso de sequências de genes de LPMOs transformadas em *E. coli*, *K. phaffii* ou outros hospedeiros são ações comuns para que se possa obter esta enzima e caracterizá-la bioquimicamente. Após a obtenção dos microrganismos transformados (bactéria ou levedura) com tais genes, buscam-se resultados para comprovar a necessidade da adição das mesmas em coquetéis enzimáticos de celulases, a fim de comprovar se as LPMOs são essenciais ao sinergismo das celulases e hemicelulases na desconstrução da parede celular vegetal (SONG *et al.*, 2018).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etanol de segunda geração

Os biocombustíveis produzidos a partir de processos de 1ª geração (1G) têm sido a força motriz das energias renováveis. Na primeira década do século XXI, houve um grande foco no debate de alimentos versus combustível. Recentemente, Mohr e Raman (2013) avaliaram a sustentabilidade da produção de E1G utilizando cultivos agrícolas. Influenciados pelo debate global, foram implementadas políticas para promover a produção de biocombustíveis líquidos a partir de matérias-primas não utilizadas para consumo humano e dar origem aos chamados biocombustíveis de segunda geração (2G) (KUBICEK, 2012).

A principal diferença entre E1G e E2G está na matéria-prima utilizada para a produção de cada um. Enquanto E1G utiliza sacarose ou amido como matéria-prima, o E2G utiliza celulose (biomassa vegetal). O E2G pode utilizar diferentes tipos de biomassas residuais de processos agroindustriais, a depender do volume de produção e características quanto à concentração de celulose (MUKTHAM *et al.*, 2016).

A celulose é o principal componente estrutural da parede celular dos vegetais, e é o carboidrato mais abundante na natureza. De modo geral, a parede celular das plantas é composta de 15-40% de celulose, 30-40% de hemicelulose e pectina e 20% de lignina. Esses componentes podem ser reduzidos a oligômeros por enzimas provenientes de fungos e bactérias. A etapa de hidrólise enzimática da parede celular vegetal faz uso de combinações de enzimas microbianas a fim de vencer a recalcitrância da celulose e lignina (HIMMEL *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2014). A glicose proveniente da celulose pode ser metabolizada por leveduras, que podem gerar etanol (SUN;CHENG, 2002; DOI;KOSUGI, 2004).

O domínio sobre a tecnologia de produção do E2G tem sido buscado mediante a solução dos gargalos do processo, tais como: tipos de pré-tratamentos, coquetéis enzimáticos e microrganismos fermentativos mais robustos. Infelizmente, o desenvolvimento do mercado de E2G tem sido mais lento do que o esperado, em função das dificuldades com tais gargalos, e assim tem custo elevado frente ao processamento de E1G (KUBICEK, 2012).

2.2 Estrutura da parede celular dos vegetais

A parede celular das plantas geralmente consiste em três camadas: parede celular primária (uma camada bastante fina que é produzida pelas células em crescimento), parede celular secundária (uma camada grossa formada dentro da parede celular primária). A parede celular secundária pode ainda ser dividida em três camadas da parede celular secundária, referidas como as lamelas S1, S2 e S3, resultantes de diferentes arranjos das microfibrilas de celulose e a lamela média, camada mais externa que forma uma interface entre as paredes primárias de duas células unindo-as (Figura 1) (KUBICEK, 2012).

A parede celular primária é constituída pelos polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina (ROSE *et al.*, 2004). A celulose se liga covalentemente à microfibrilas das cadeias de hemicelulósicas e formam uma rede de celulose-hemicelulose que está embutida na matriz de pectina. A parede celular primária é uma estrutura mecanicamente mais maleável em relação à parede celular secundária. A parede celular secundária é quem determina a forma e o tamanho da célula madura. As paredes celulares primárias são constituídas por fibrilas de celulose entrelaçadas em uma mistura amorfa de polissacarídeos e glicoproteínas (matriz da parede celular primária). A celulose é mais abundante na parede celular secundária contendo quantidade significativa de lignina trançada com a celulose. Os polímeros das paredes celulares primárias são geralmente mais fáceis de isolar do que das paredes secundárias (YORK *et al.*, 1986).

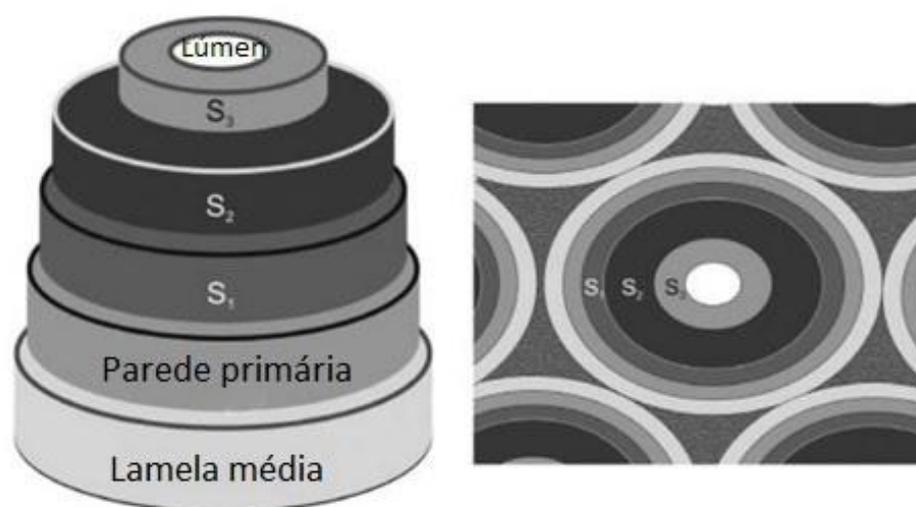


Figura 1. Organização da parede celular vegetal (adaptado de KUBICEK, 2012).

A celulose é considerada o biopolímero mais abundante e utilizado do planeta, composto normalmente de 35 a 50% do peso seco das plantas. É formada pela ligação β -1,4-glicosídica entre os monômeros de β -D-glicose que primeiramente origina um dímero chamado celobiose. Várias celobioses unidas formam a celulose, como visto na Figura 2 (LYND et al., 2002; KUBICEK, 2012). A celulose participa de diversas funções para manutenção da célula vegetal como diferenciação celular, comunicação celular, defesa, controle do movimento da água, crescimento da planta e suporte estrutural (COSGROVE, 2005; GUPTA et al., 2016).

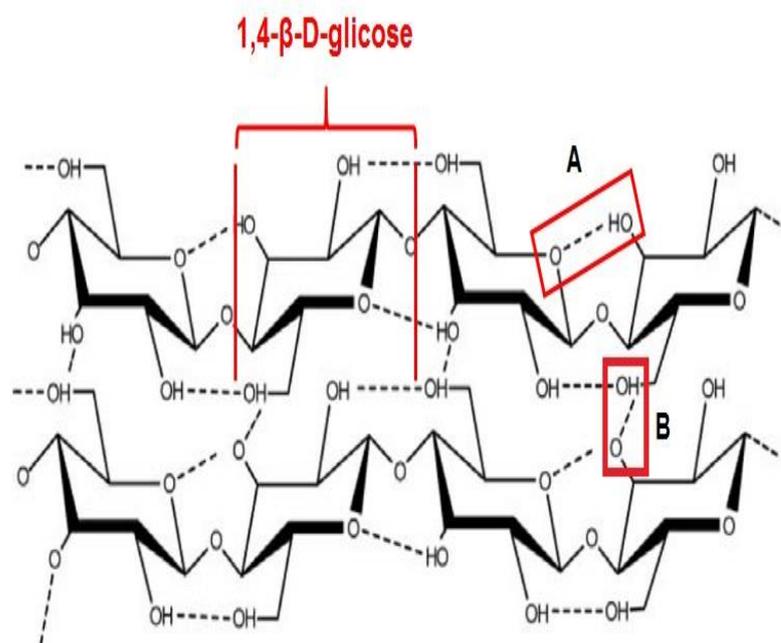


Figura 2. Estrutura da celulose. A celulose é um polímero formado por monômeros de β -D-glicose unidos por ligações covalentes do tipo β -1,4. As celulosas são firmemente ligadas entre si por pontes de hidrogênio, tanto por ligações intramoleculares (A), quanto por ligações intermoleculares (B), formando então o polímero de celulose. Fonte: adaptado de Kubicek (2012).

A síntese da celulose ocorre por meio da enzima celulose-sintase que se organiza formando um complexo de aproximadamente 36 subunidades em forma de roseta, que é organizada em hexâmero, sendo que cada unidade do hexâmero possui 6 enzimas. O complexo enzimático consegue formar microfibrila de 36 unidades de β -D-glicose que são estabilizadas por pontes de hidrogênio. A disposição lado a lado das microfibrilas, e juntamente com outros polissacarídeos, formam a macrofibrila que constitui a parede celular (FESTUCCI-BUSELLI *et al.*, 2007). Durante a formação das microfibrilas de celulose, outros polissacarídeos, hemicelulose e pectinas, se prendem formando uma rede complexa de polissacarídeos que é resistente e extensa (COSGROVE, 2005).

São encontrados diferentes tipos de hemiceluloses na parede celular das plantas, dependendo do tipo de açúcar que as constitui, como xiloglicanas, xilana, mananas e glucomananas, podendo estar associadas com a parede celular primária ou secundária (SCHELLER;ULVSKOV, 2010).

Pectina é o terceiro polissacarídeo encontrado na parede celular das células vegetais. Este polissacarídeo também se divide em diferentes tipos de acordo com os açúcares que a constitui, sendo conhecidos os homogalacturonano, xilogalacturonano, apiogalacturonano, ramnogalacturonana I e Ramnogalacturonana II (MOHNEN, 2008; CAFFALL;MOHNEN, 2009; HARHOLT *et al.*, 2010).

A lignina é encontrada em todas as plantas vasculares, estando presente na parede celular. A lignina é uma macroestrutura formada por complexos de aldeídos aromáticos que preenchem os espaços entre celulose, hemicelulose e componentes de pectina da parede celular. Devido à sua natureza hidrofóbica, expulsa a água e fortalece a parede. Constituída por três diferentes unidades de fenilpropano: guaiacil (G), sinapil (S) e p-hidroxifenil (H) que são unidas por diferentes tipos de ligações. A relação desses fenilpropanóides pode diferenciar nos tipos de vegetais como: na gimnosperma (madeira macia) contendo principalmente unidades G e níveis muito baixos de unidades H, na angiosperma (madeira dura) é composta por níveis semelhantes de unidades G e S com traços de unidades H. Monocotiledôneas (gramíneas) contêm todas as três unidades em proporções diferentes (MOSIER *et al.*, 2005; HENDRIKS;ZEEMAN, 2009; KUBICEK, 2012). A presença de lignina em algumas paredes celulares confere suporte estrutural à planta, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos e estresse oxidativo.

A deslignificação da parede celular é um dos principais gargalos no processo de obtenção de E2G. Tanto nas etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação; em função da adsorção dos fragmentos de lignina ou formação de substâncias inibidoras de enzimas ou do crescimento microbiano, respectivamente (SUN;CHENG, 2002; ZENG *et al.*, 2014).

2.3 Pré-tratamento da biomassa vegetal

A conversão de lignocelulose (celulose, lignina, hemicelulose) em E2G é feita basicamente em três etapas: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. O pré-tratamento da biomassa vegetal é essencial para a conversão máxima da celulose em glicose e conseqüentemente etanol (WYMAN *et al.*, 2005; LIN;TANAKA, 2006). Diversos estudos têm mostrado a eficiência do pré-tratamento para remover lignina, hemicelulose

e redução da cristalinidade da celulose para melhorar significativamente a hidrólise. Entretanto, no pré-tratamento deve-se evitar a degradação ou perda de carboidratos, evitar a formação de subprodutos inibitórios tanto para a hidrólise enzimática como para o processo de fermentação, além de ser economicamente viável. Existem diversos tipos de pré-tratamento, dentre eles os físicos (trituração mecânica, pirólise), físico-químico (explosão a vapor, auto-hidrólise, explosão de fibra de amônia - AFEX, explosão com CO₂); químicos (ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa, processo organo-solvente) e pré-tratamento biológico (macrofungos – fungos de podridão branca ou parda). Após o pré-tratamento, espera-se que a biomassa esteja desestruturada de forma a facilitar a hidrólise enzimática e fermentação (Figura 3) (SUN;CHENG, 2002; MOSIER *et al.*, 2005; HENDRIKS;ZEEMAN, 2009).

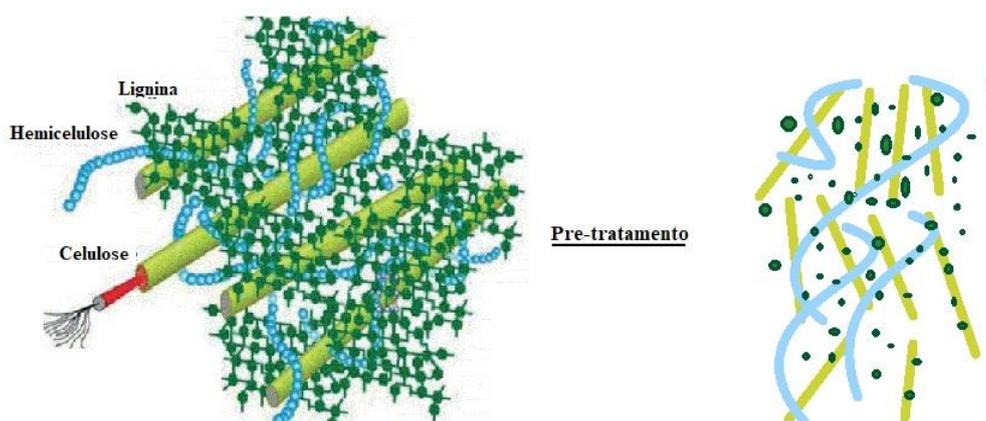


Figura 3. Esquema adaptado do efeito do pré-tratamento sobre a lignocelulose. Fonte: adaptado de Wang *et al.* (2017)

2.4 Enzimas envolvidas na desconstrução da biomassa vegetal

Os fungos são degradadores naturais de biomassas vegetais, sendo capazes de desconstruir a lignocelulose para obtenção de moléculas fundamentais para a manutenção do metabolismo. Diferentes mecanismos enzimáticos são utilizados diferenciando-se pela forma como estes organismos tornam as celuloses e hemiceluloses acessíveis para a degradação. Os três tipos de fungos envolvidos nessa degradação geralmente são: os fungos de podridão branca, parda e branda (KUBICEK, 2012).

Existem basicamente duas formas de degradação enzimática da biomassa lignocelulósica: hidrolítica (holocelulases: celulasas e hemicelulasas) e oxidativa

(ligninases: lacases e peroxidases). Como o nome sugere, as celulases e hemicelulases clivam a celulose e hemicelulose. As reações ocorrem junto às pontes de hidrogênio desses polissacarídeos, em posições específicas para cada enzima. As lacases e peroxidases são enzimas que reagem por oxirredução das estruturas que compõem a lignina.

A hidrólise da biomassa é mais eficiente quando catalisada por coquetéis de enzimas incluindo principalmente as celulases (exo- e endoglicanases e celobiohidrolases), as hemicelulases (xilanases), ligninases (lacases, peroxidases) e outras enzimas acessórias (catalases, mono-oxigenases).

Recentemente, novas enzimas foram identificadas como auxiliares na desconstrução da celulose e hemicelulose através de reações oxidativas como as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) que conjuntamente degradam componentes específicos da parede celular. O sinergismo entre as três celulases já fora evidenciado, onde endoglicanases clivam as ligações internas da fibra de celulose gerando oligossacarídeos de vários tamanhos; as exoglicanases atuam na região externa da celulose produzindo celobiose; enquanto β -glicosidases clivam os dímeros de celobiose em glicose.

As celobiohidrolases I e II, assim como as endoglicanases, agem na cadeia de celulose insolúvel de extremidades redutoras e não redutoras, respectivamente, produzindo celobiose e pequenas quantidades de glicose e celotriose (LYND *et al.*, 2002; KUMAR; WYMAN, 2014). Como descrito por Holtzaple *et al.* (1990) e Kristensen *et al.* (2009) glicose e celobiose em alta concentração causam inibição das celulases. As β -glicosidases hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose, reduzindo a retroalimentação negativa em uma hidrólise enzimática.

A utilização de outras enzimas que suplementam as celulases em uma hidrólise pode aumentar a liberação da glicose basicamente de duas formas: reduzindo a inibição das celulases e deixando a celulose mais exposta à ação das celulases. Um coquetel enzimático ideal para sacarificação da biomassa vegetal pode ser composto em diferentes concentrações por: endoglicanase, exoglicanase, β -glicosidases, mono-oxigenases líticas de polissacarídeos, xilanases, pectinases, lacases e expansinas (proteínas acessórias que agem abrindo a fibra da biomassa, deixando-a assim mais expostas aos ataques enzimáticos) (LYND *et al.*, 2002; ZHANG; LYND, 2004; ARANTES; SADDLER, 2010; KUMAR; WYMAN, 2014).

Fungos de podridão branca

Os fungos de podridão branca (inglês, *White-rot fungi* – WRF) atuam em madeiras duras e macias. Possuem capacidade para produzir enzimas extracelulares que modificam a lignina (GUILLÉN *et al.*, 2005)

Os fungos de podridão branca são os únicos microrganismos conhecidos até então capazes de degradarem completamente a estrutura da madeira, capaz de despolimerizar a celulose (hexose), hemicelulose (hexose e pentose) e a lignina, dividindo a ligação entre os átomos de C α e C β . A podridão branca é tipicamente associada à decomposição da madeira dura e o material resultante tem uma aparência uniformemente branca, daí a nomenclatura (KUBICEK, 2012).

Os fungos de podridão branca secretam enzimas extracelulares que são essenciais para a degradação da lignina e que combinam com outros processos para efetuar a mineralização da lignina, as chamadas enzimas modificadoras de lignina (LMEs, sigla em inglês para *Lignin-Modifying Enzyme*). As LMEs são agrupadas em peroxidases, lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), fenoxidase contendo cobre, lacase (Lac, EC 1.10.3.2).

2.4.2 **Fungos de podridão parda**

Os fungos de podridão parda (inglês, *Brown-rot fungi* – BRF) degradam extensivamente a holocelulose (celulose e hemicelulose) da madeira, enquanto apenas modificam, ao invés de degradar de lignina. Os fungos de podridão parda atacam prevalentemente madeira das espécies das coníferas (KUBICEK, 2012). A degradação da podridão parda é considerada mais agressiva quanto ao processo de degradação da celulose, quando comparada com a podridão branca, ou seja, reduzindo mais a resistência das plantas em função do ataque à holocelulose (TUOMELA *et al.*, 2000; GOODELL, 2003).

Fungos de podridão branda

Os fungos de podridão branda ou macia (inglês, *Soft-rot fungi* – SRF) são característicos do grupo dos ascomicetos e podem ser distinguidos em dois tipos: 1) onde o fungo forma cavidades longitudinais dentro da parede secundária da planta; e, 2) onde toda a parede secundária é colonizada. Estes fungos diferem principalmente dos

fungos de podridão branca por não atacar a lamela média e pouco ou nenhum envolvimento de ligninases. As principais enzimas utilizadas pelos fungos de podridão branca são celulases e hemicelulases, no que tange a degradação da parede celular vegetal (KUBICEK, 2012).

Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, em inglês)

Previamente denominadas como Glicosil Hidrolase 61 (GH61), as LPMOs de 2.4.4 fungos, são hoje classificadas como acessórias ou *Auxiliary Activity 9* (AA9). As LPMOs são enzimas que clivam de forma oxidativa (e não hidrolítica) os carbonos C1 e C4 (Figura 4) das moléculas de celulose, aumentando a eficiência das celulases uma vez que haverá mais celulose expostas para ação das exo e endoglicanases (HARRIS *et al.*, 2010) (QUINLAN *et al.*, 2011; LEVASSEUR *et al.*, 2013; BUSK;LANGE, 2015). A família AA inclui as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos, contendo cerca de 427 acessos no *GenBank*. Sendo que as AA9 são apenas encontradas em genomas de fungos, indicando a grande diversidade desta família, especialmente nos fungos degradadores da madeira (LEVASSEUR *et al.*, 2013).

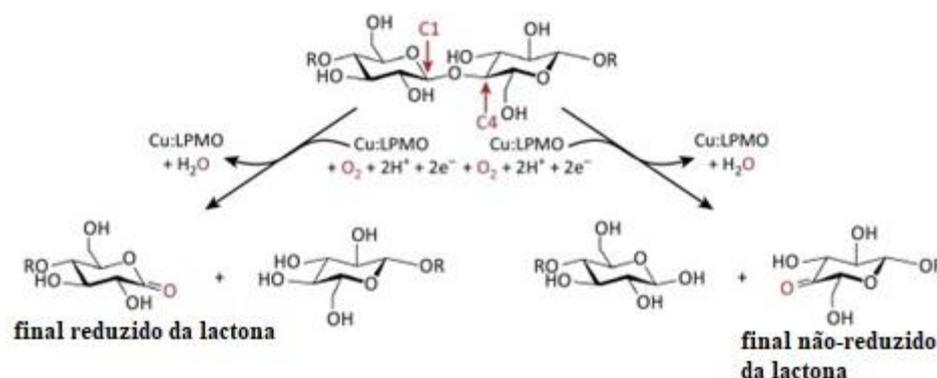


Figura 4. Reação oxidativa da LPMO nos carbonos C1 e C4. Fonte: adaptado de Hemsworth *et al.* (2015)

Mais recentemente, diversos estudos têm mostrado que as LPMOs agem em sinergismo com enzimas que despolimerizam hemicelulose (xilana, xiloglucana, manana), pectina ou amido, além da celulose (Figura 5). Essas enzimas foram identificadas principalmente em genomas de fungos (LEVASSEUR *et al.*, 2013; AGGER *et al.*, 2014).

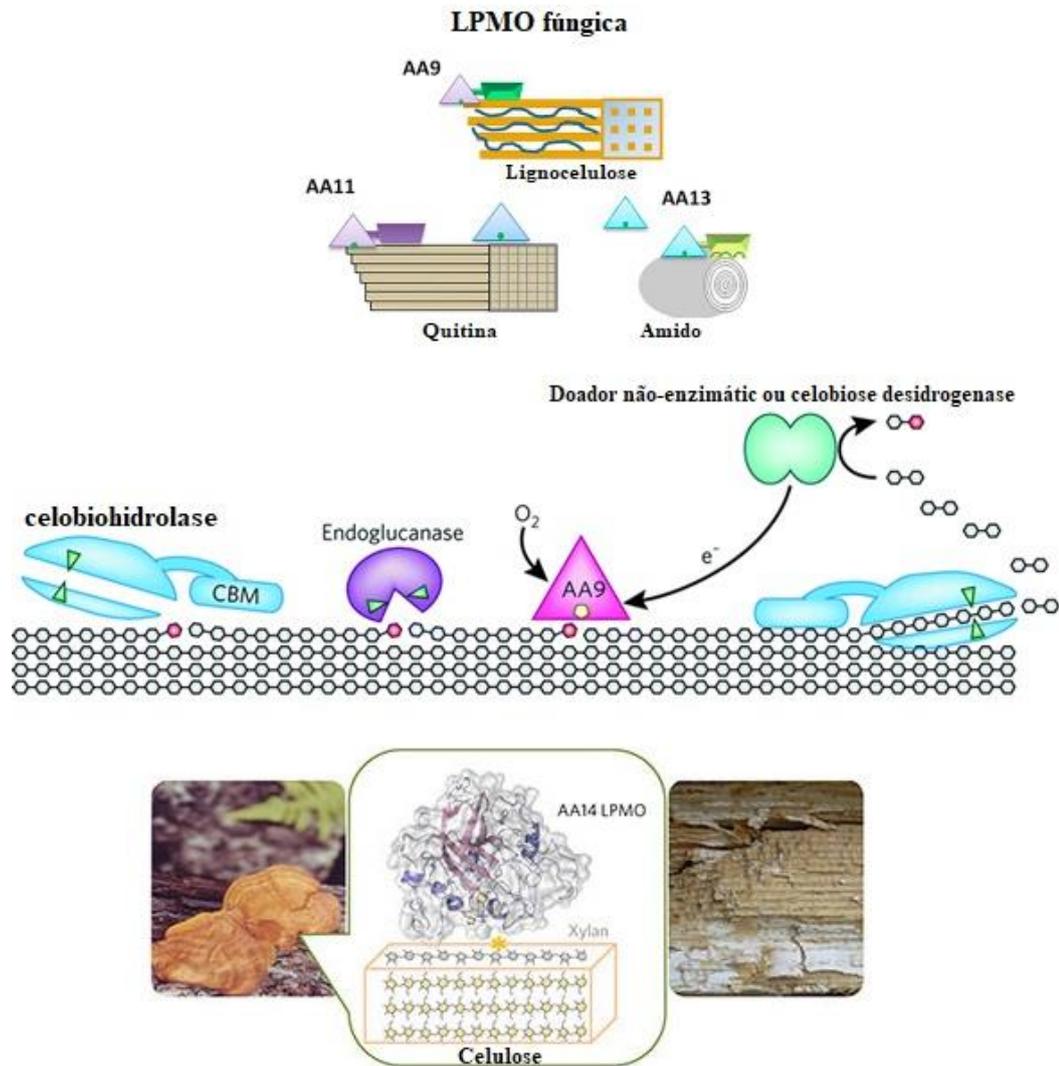


Figura 5. Esquemas das ações sinérgicas de enzimas fúngicas degradadoras da parede celular vegetal (celulases, hemicelulases, LPMOs). Fonte: adaptado de Dutta e Wu (2014).

As LPMOs são enzimas com atividade catalítica dependente de cofatores como o cobre, na presença de oxigênio e um doador de elétrons responsável por ciclar o cobre em Cu (I) e Cu (II) para ativar a molécula de oxigênio, como a celobiose desidrogenase, o ácido ascórbico ou ácido gálico (VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2010; LANGSTON *et al.*, 2011; QUINLAN *et al.*, 2011). Porém Westereng *et al.* (2015) demonstraram que a lignina pode também atuar como doador de elétrons para a LPMO (). A lignina sendo um dos principais componentes estruturais das plantas proporciona uma nova abordagem que levanta novas questões interessantes para outras pesquisas, o que poderá acarretar em um processo industrial mais eficiente sobre a biomassa.

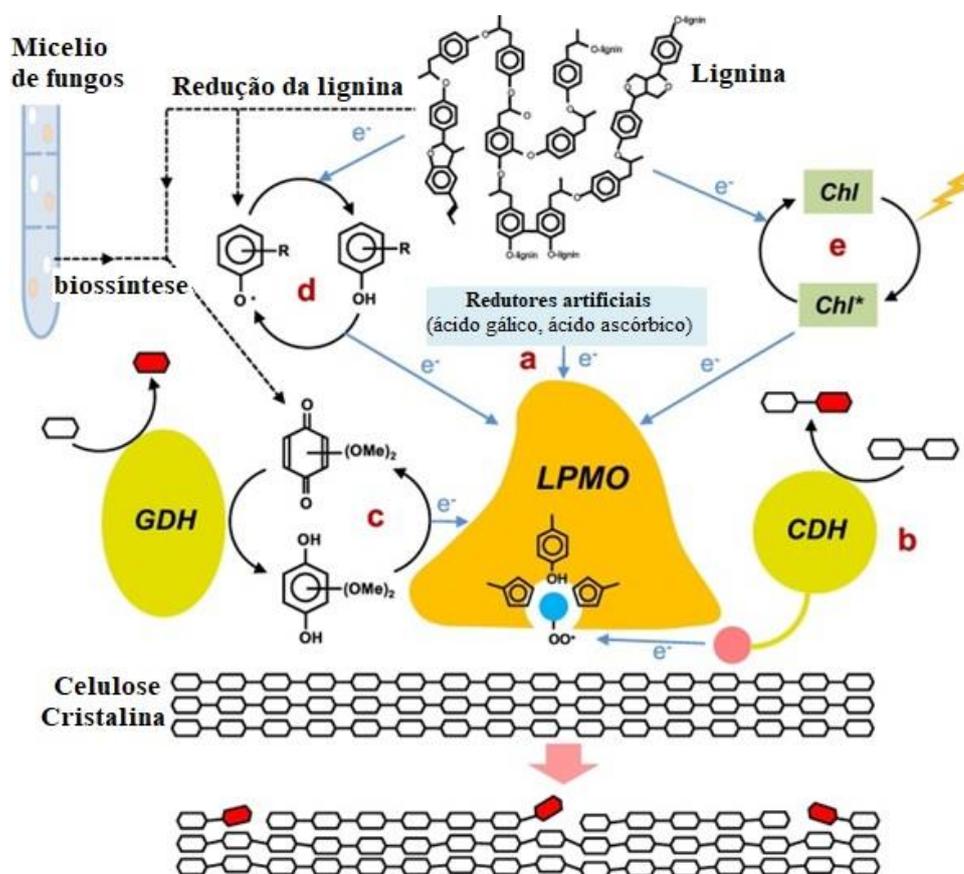


Figura 6 Diferentes rotas de ação das LPMOs fúngicas (basidiomicetos). Rota a) rota oxidativa da LPMO via cofator de cobre artificial como ácido gálico e ascórbico; Rota b) rota oxidativa da LPMO via GDH; Rota c) ação redox via degradação da lignina via enzimas fúngicas; rota d) radicais fenólicos derivados da lignina; Rota e) ativação via pigmentos fotossintéticos. Fonte: adaptado de Martinez *et al.* (2017)

Todas as LPMOs possuem uma dobra estrutural comum com uma superfície onde a ligação com o substrato ocorre principalmente através de interações com resíduos aromáticos. Um íon de cobre de tipo II exposto na superfície é coordenado pelos átomos de nitrogênio de dois resíduos de histidina altamente conservados, um dos quais corresponde à histidina N-terminal (Figura 7) (BENNATI-GRANIER *et al.*, 2015).

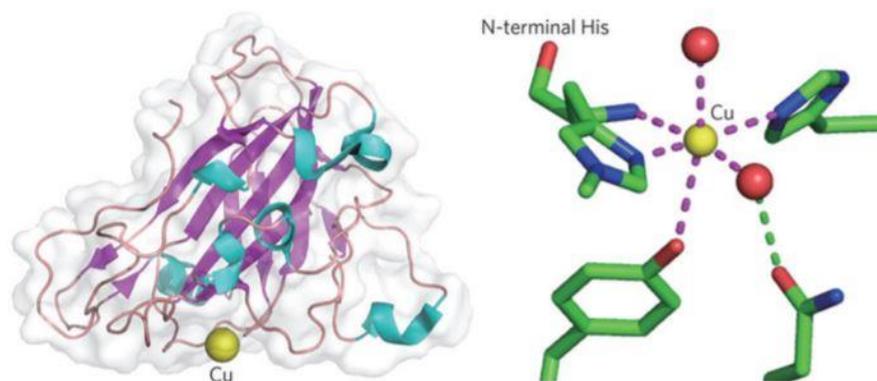


Figura 7 Ilustrações da estrutura da superfície (esquerda) e do sítio ativo de cobre (direita) da LPMO AA9 do fungo *Thermoascus aurantiacus* (Fushinobu, 2014)

2.5 LPMOs: Expressão heteróloga em *Komagataella phaffii*

Por longo tempo a bactéria *Escherichia coli* tem sido usada como sistema para a expressão de proteínas heterólogas. Porém, para expressar proteínas de origem eucariótica que podem exigir uma modificação pós-traducional, o sistema de expressão bacteriano apresenta limitações, em virtude de *E. coli* não possuir a maquinaria necessária para essas modificações (DALY;HEARN, 2005). A produção de diversas LPMOs de fungos por *K. phaffii* (*Pichia pastoris*) já foi descrita por alguns autores (KITTL *et al.*, 2012; BEY *et al.*, 2013). Além de modificações pós-traducionais, *K. phaffii* tem sido usada para produção de proteínas de origem eucariótica pois é capaz de realizar o processamento bem como a dobragem de proteínas, e as ferramentas para sua manipulação genética já são bem estabelecidas.

K. phaffii é uma levedura metilotrófica, capaz de metabolizar o metanol como única fonte de carbono. O primeiro passo no metabolismo do metanol é a oxidação do metanol para o formaldeído usando oxigênio molecular pela enzima álcool oxidase gerando ao final peróxido de hidrogênio. A enzima álcool oxidase tem baixa afinidade com o oxigênio, e com isso ela compensa gerando grandes quantidades da enzima. Essa característica é importante, pois, durante a indução da expressão da proteína é

necessário que a quantidade de oxigênio permaneça alta, pois o gene de interesse será inserido sob controle do promotor do gene da enzima álcool oxidase (AOX1 e AOX2). A regulação do gene AOX1 é um processo que envolve dois passos: um mecanismo de repressão seguida de um mecanismo de indução. Sendo assim o crescimento em glicerol é recomendado antes da indução com metanol (TSCHOPP *et al.*, 1987). O crescimento em metanol com AOX2 é muito mais lento do que com AOX1, portanto a perda do gene AOX1 resulta em uma cepa fenotipicamente Mut^S (*methanol utilization slow*). As cepas que possuem o gene AOX1 possuem o fenótipo Mut⁺ (*methanol utilization plus*).

A proteína heteróloga produzida por *K. phaffii* pode ser intracelular ou pode ser secretada. Para que a proteína seja secretada, necessita de uma sequência sinal na proteína para que seja direcionada para a via de secreção. A sequência sinal de secreção que tem sido utilizada com sucesso é a de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (DALY;HEARN, 2005). Porém, Tanghe *et al.* (2015) estudou a produção de LPMO de fungos utilizando diversos promotores e chegou à conclusão de que a sequência sinal nativa da proteína tem sido mais efetiva considerando a importância do processamento correto da histidina N-terminal preservando o sítio de cobre.

3 JUSTIFICATIVA

O crescimento da demanda energética e as preocupações ambientais têm levado à busca por novos processos industriais, como a produção de energia renovável, com objetivo de diversificar a matriz energética. Os combustíveis fósseis são fontes de energia finitas e sua demanda tem aumentado ao longo dos anos. O etanol de segunda geração (E2G) pode ser uma garantia de produção energética para o futuro. Para produção de E2G pode-se utilizar resíduos e coprodutos da agroindústria aproveitando a celulose da estrutura química para conversão em açúcar para uma posterior fermentação alcoólica. Como já mencionado, essas celuloses não estão totalmente acessíveis às enzimas devido à interação dos componentes da lignocelulose (recalcitrância). A recalcitrância é um dos principais focos de estudo em todo o mundo, quanto à produção de etanol de segunda geração.

Nesse sentido, a comunidade científica tem encontrado algumas dificuldades para produção do biocombustível E2G, tais como:

- Melhoria das características estruturais da matéria-prima;
- Aperfeiçoamento da etapa de pré-tratamento da biomassa;
- Aumento da eficiência da hidrólise enzimática de biomassa e diminuição dos custos de produção de enzimas;
- Desenvolvimento de estratégias fermentativas eficientes dos açúcares provenientes da hidrólise enzimática.

Sendo então, a hidrólise enzimática ainda é um fator limitante na produção de biocombustíveis de segunda geração. Estudos mais aprofundados sobre produção e aplicação de LPMOs, como o presente trabalho, podem ajudar na redução da recalcitrância da biomassa, e conseqüentemente reduzir o gasto com os coquetéis enzimáticos. Uma vez que o acesso das enzimas à celulose é melhorado pela ação dessas oxidases, menores quantidades de enzimas seriam suficientes para degradar a celulose com a mesma ou maior eficiência.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Obter mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) de origem fúngica produzidas por *Komagataella phaffii*, e avaliar o efeito da adição dessas proteínas aos extratos brutos de fungos produtores de celulasas (*Trichoderma reesei* RUT-C30) e β -glicosidase (*Aspergillus aculeatus* F-50), durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise.

4.2 Objetivos específicos

- Objetivo específico 1: Selecionar genes de LPMOs de fungos, clonar em vetor de expressão pPICZ α A e transformar *K. phaffii*;
- Objetivo específico 2: Selecionar transformantes de *K. phaffii* que produzam as LPMOs heterólogas e purificar as proteínas secretadas;
- Objetivo específico 3: Analisar a eficiência do processo de produção e hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise com coquetel enzimático contendo a LPMO heteróloga produzida por *K. phaffii*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção e síntese de genes candidatos

A seleção dos genes de LPMOs de fungos filamentosos foi realizada utilizando e as bases de dados de domínio público CAZY (*Carbohydrate-Active enZymes Database*) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Foram seguidos as seguintes metodologias de trabalho para seleção dos genes candidatos: revisão de literatura e de patentes, análise filogenética, taxonomia e biologia das espécies e capacidade de degradação de polissacarídeos. Dessa forma, cinco genes foram selecionados provenientes de fungos das classes Ascomycota e Basidiomycota (microrganismos 1 a 5). Também foi selecionado para síntese um gene de LPMO (TrCel61A) do fungo ascomiceto *Trichoderma reesei*, já caracterizada na literatura quanto a sua atividade enzimática (Pierce et al., 2017), utilizado como modelo e padrão de comparação nas etapas posteriores do trabalho.

Apesar dos estudos de Tanghe *et al.* (2015) demonstrar que o peptídeo sinal nativo para secreção tenha sido mais eficiente, optamos por substituir a sequência do peptídeo sinal nativo para secreção das proteínas pela sequência sinal denominada α -factor, nativa de *Saccharomyces cerevisiae* existente no vetor de expressão de *K. phaffii*, pPICZ α A (Life Technologies – Figura 8) uma vez que existem mais trabalhos utilizando esse sinal de secreção.

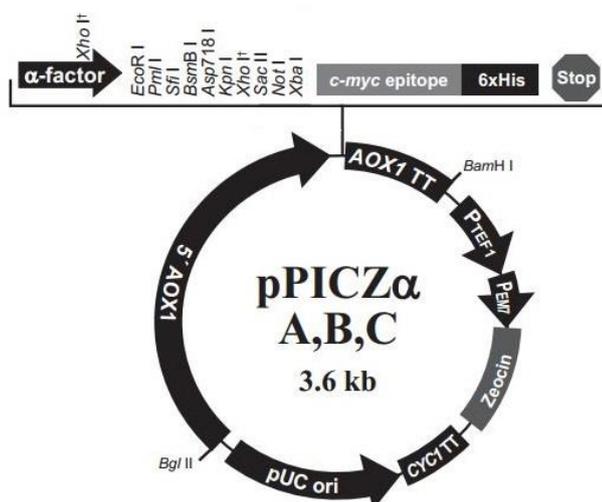


Figura 8 - Mapa do vetor pPICZ α A

Após a remoção das sequências não-alvo (peptídeo sinal nativo), foi necessário fazer análise destes genes modificados, de forma a garantir a integridade do *frame* (fase

de leitura) das construções para subclonagem no vetor de expressão (pPICZ α A). Nesta etapa, também foram inseridos dois sítios de restrição: um para a enzima *Eco*RI (extremidade 5') e outro para *Xba*I (extremidade 3'). As construções foram analisadas utilizando o programa Geneious versão 7.1.8., e foi necessário adicionar dois nucleotídeos antes do sítio da enzima de restrição *Xba*I, com o objetivo de manter as construções em *frame* (essencial para a tradução correta das proteínas).

As sequências foram submetidas e otimizadas na plataforma *GeneArt* (Life Technologies), e posteriormente, foram sintetizadas e clonadas em vetor de expressão para *K. phaffii*. Os nomes das espécies e sequências selecionadas não estão presentes no documento devido a contratos de confidencialidade, sendo assim, os genes serão nominados de 1 a 5, sendo 1 a 3 provenientes de Basidiomycota e 4 e 5 provenientes de Ascomycota. Os processos de clonagem e indução dos genes microbianos (fungos) de LPMOs estão sumarizados no Diagrama de Blocos da Figura 9. Esta etapa foi realizada em conjunto com Dra. Kelly Barreto Rodrigues (Embrapa Agroenergia)

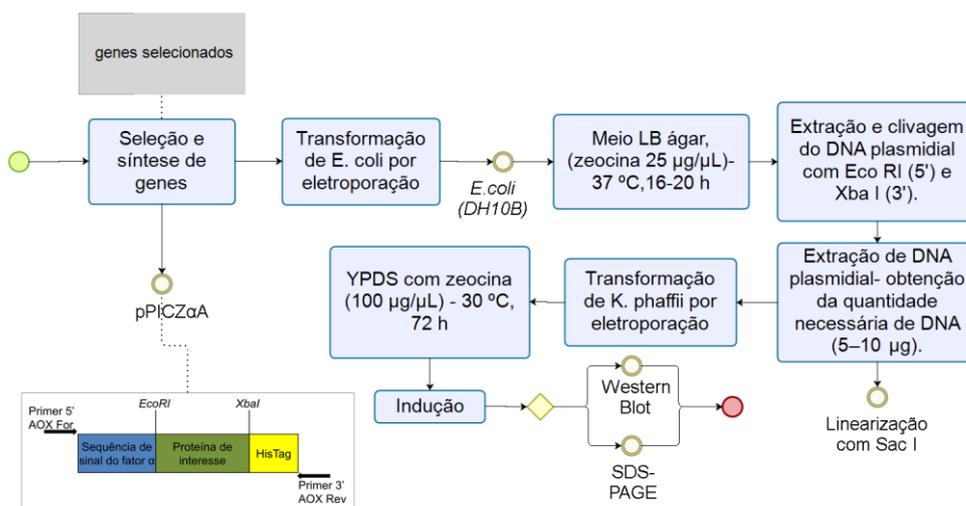


Figura 9. Representação esquemática do processo de clonagem e indução dos genes de LPMOs selecionados.

5.2 Preparação de células eletrocompetentes de *E. coli*

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B foram preparadas para transformação por eletroporação, adaptando o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001), detalhado a seguir:

- Pré-inoculo de *E. coli*, cepa DH10B, foi feito em 10 mL de meio Luria Bertani (LB -triptona – 1%, extrato de levedura – 0,5% e NaCl – 1,0%, pH 7) por 16 a 20 h, sob agitação de 4 g a 37°C.
- Cinco mL deste pré-inoculo crescido *overnight* foram inoculados em 200 mL de meio LB e incubados sob as mesmas condições, até atingir densidade óptica (DO - 600nm) entre 0,4 e 0,6.
- Depois de atingir essa DO, as células foram colocadas no gelo por 30 min. Em seguida, foi feita centrifugação a 1500g por 25 min a 4°C. Foi descartado o sobrenadante e o *pellet* ressuspenso em 25 mL de água, outra centrifugação foi realizada a 1500g por 25 min a 4°C, etapa realizada duas vezes.
- Uma nova centrifugação foi realizada a 2000g por 15 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em 15 mL de glicerol 10%. Uma última centrifugação sob mesma condição e o *pellet* novamente ressuspenso em 500 µL de glicerol 10% gelado.
- Alíquotas contendo 50 µL de células competentes foram preparadas e estocadas a -80°C até a sua utilização.

O teste de competência das células foi feito com 0,1 ng do vetor comercial pUC19 (Invitrogen). Cinquenta microlitros de células eletrocompetentes foram adicionados ao vetor e após isso todo o volume foi retirado e adicionado na cubeta de eletroporação. Essas células foram levadas ao eletroporador a 1,8 kV, 200 Ω e 25 µF. Para remover as células da cubeta foram adicionados 800 µL de meio SOC (extrato de levedura – 0,5%, NaCl – 10 mmol/L, KCl – 2,5 mmol/L, MgCl₂ – 10 mmol/L, triptona – 2%, e glicose – 20 mmol/L), as quais foram transferidas para novo tubo e incubadas a 37°C por 1 h, com agitação de 4 g. Após esse período foram plaqueados 100 µL das células transformadas em meio LB-ágar (triptona – 1,0%, extrato de levedura – 0,5%, NaCl – 1,0% e ágar bacteriológico – 1,5%, pH 7) contendo ampicilina (100 µg/mL), X-Gal (80 µg/mL) e IPTG (0,5 mM) para seleção das células transformadas. As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 h, até a obtenção de colônias. Após esse período, foi realizada a contagem de UFC/µg de DNA, dividindo o número de colônias crescidas na placa (UFC – Unidades Formadoras de Colônias) pela quantidade de microgramas (µg) de DNA utilizado na transformação.

5.3 Transformação de *E. coli* com o vetor pPICZαA contendo os genes de LPMOs de fungos

Os 6 genes sintetizados de LPMOs de fungos foram recebidos clonados em vetor pPICZαA na forma liofilizada, contendo 5 µg de DNA. Estes foram então ressuspendidos em 50 µL de tampão de eluição (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), para serem armazenados a uma concentração estoque de 100 ng/µL. As transformações de *E. coli* foram realizadas com 2 µL do DNA plasmidial previamente diluído do estoque (10 ng/µL), nas mesmas condições anteriores. Imediatamente após a eletroporação, adicionou-se 800 µL de meio SOC na cubeta, as quais foram transferidas para um novo tubo e incubadas a 37°C por 1 h, sob agitação de 4 g. (SAMBROOK;RUSSEL, 2001). Em seguida, as células foram plaqueadas em meio de cultura LB Agar contendo zeocina (25 µg/mL) e crescidas a 37 °C, por 16-20 horas

5.4 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

De cada transformação, foram selecionadas três colônias de *E. coli* transformadas, que então foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo zeocina (25 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16-20 h, sob agitação de 4 g.

Para confirmar a transformação foi feita a extração do DNA plasmidial utilizando o kit ‘*QIAGEN Plasmid mini Kit*’ e então realizada a clivagem do DNA plasmidial (50 ng/µL) com *EcoRI* 5 U/µL (extremidade 5´) e *XbaI* 10 U/µL (extremidade 3´). Os reagentes foram misturados (volume final de 10 µL) e as reações foram incubadas a 37°C por 16 a 20 h. A análise foi feita com uma alíquota do material digerido em gel de agarose 1% (Tabela 1), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

Tabela 1. Preparação de gel de agarose 1%.

Reagentes	Quantidade
Tampão de corrida TAE 1X (<i>Thermo Scientific</i>)	100 mL
Agarose	1 g
Brometo de etídeo	4 µL (10 mg/mL)

5.5 Transformação de *K. phaffii* com os plasmídeos recombinantes (pPICZalphaA) contendo as LPMOs de fungos

Preparação dos plasmídeos

Depois de confirmada a transformação de *E. coli*, foi feita outra extração de DNA plasmidial utilizando kit 'QIAGEN Plasmid Midi Kit' para obtenção da quantidade necessária de DNA plasmidial (5–10 µg). Antes de transformação de *K. phaffii* (X-33) foi feita análise *in silico* das sequências, utilizando a ferramenta online NEBcutter V2.0, para verificar se existia apenas um único sítio de restrição para essas enzimas. Dessa forma, a enzima selecionada para linearizar esses vetores foi a *SacI* (Invitrogen). Aproximadamente 5 µg de DNA plasmidial foram linearizados com a enzima de restrição *SacI*, utilizando-se os seguintes reagentes: tampão *SacI* 10X, *Sac I* 10 U/µL e água destilada para um volume final de 100 µL. Os reagentes foram misturados com o DNA plasmidial e as reações foram incubadas a 37°C por 16 a 20 h, resultando na linearização do plasmídeo.

Esta linearização é necessária para que ocorra a integração do gene de interesse no genoma da levedura, uma vez que o DNA plasmidial é circular e o DNA da levedura é não-linear, assim é necessário para a inserção do vetor no genoma do fungo. Após este período, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, para confirmar a linearização dos plasmídeos, que foram então purificados por precipitação com etanol (SAMBROOK;RUSSEL, 2001), como descrito a seguir. Primeiramente, foi adicionado 1/10 do volume em cada tubo de plasmídeo linearizado de acetato de sódio 3 mols/L e 2,5 vezes o volume de etanol e incubados por 1 h a -80°C. Depois as amostras foram descongeladas lentamente em banho de gelo e centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g, lavadas com 1 mL de etanol 70% e secas em concentrador a vácuo por 3 min. Essas amostras foram ressuspensas em 10 µL de água destilada, sendo este o volume que foi utilizado na transformação de *K. phaffii*.

Preparação de células eletrocompetentes de *K. phaffii*

Antes de iniciar a transformação com os plasmídeos previamente preparados, foi necessário preparar as células da levedura *K. phaffii* para torná-las eletrocompetentes. As transformações foram feitas de acordo com o protocolo 'EasySelect™ *Pichia Expression Kit*' (Invitrogen).

- Uma única colônia de *K. phaffii*, linhagem X-33, crescida em placa contendo o meio *Yeast Extract Peptone Dextrose+Sorbitol* (YPDS - extrato de levedura – 1,0%, peptona – 2,0%, glicose – 2,0%, sorbitol – 1 mol/L e ágar – 2,0%) foi inoculada em 10 mL de meio YPD e incubada a 28°C, 7 g por 18 a 20 h.
- Alíquota de 1 a 3 mL deste pré-inoculo crescido *overnight* foi inoculada em 200 mL de meio YPD e incubado sob as mesmas condições, até atingir DO 600_{nm} entre 1,3 e 1,5.
- As células foram centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos a 4°C, quatro vezes. A primeira centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 200 mL de água Mili-Q estéril gelada. Na segunda, o pellet foi ressuspendido em 100 mL de água Mili-Q estéril gelada. Na terceira, em 20 mL de sorbitol 1 mol/L gelado. E na quarta centrifugação, as células foram ressuspendidas em 0,4 mL de sorbitol 1 mol/L gelado. Alíquotas contendo 80 µL de células competentes foram mantidas no gelo até a realização da transformação. Diferentemente das células de *E. coli*, as leveduras não podem ser armazenadas a -80°C para uso posterior por não resistir à temperaturas muito baixas (SAMBROOK;RUSSEL, 2001).

5.5.3

Transformação de *K. phaffii*

A transformação ocorreu adicionando-se 5 µg de DNA plasmidial linearizado juntamente com 80 µL de células X33 eletrocompetentes em cubetas. Após 5 min de incubação no gelo, a eletroporação foi realizada com os seguintes parâmetros: 1500 V, 25 µF, 400 Ω. Imediatamente, as leveduras foram removidas da cubeta adicionando-se 1 mL de sorbitol 1 mol/L gelado e transferindo para um tubo estéril de 15 mL. O frasco foi incubado a 30°C, sem agitação, por 2 h. Após esse período, foram plaqueados 100 µL de cada transformação em YPDS com zeocina (100 µg/µL) e incubadas a 30°C, por até 72 horas. As colônias que cresceram foram repicadas em placas para cultura de células com 96 poços (*deep well*) contendo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) e zeocina (100 µg/µL) por até 48 horas, e, posteriormente, criopreservadas (glicerol 30%).

Seleção de transformantes de *K. phaffii* por PCR

Após a transformação, foi feito um *screening* dos transformantes de *K. phaffii* por meio de PCR utilizando DNA genômico de *K. phaffii* como molde, o qual foi obtido através da lise das leveduras utilizando o protocolo adaptado do manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit*. A concentração foi determinada pela leitura do DNA genômico em espectrofotômetro. O DNA foi então diluído para se obter uma concentração abaixo de 10 ng/μL. Para realizar a PCR, foram utilizados *primers* específicos que flanqueiam as regiões 5' e 3' do promotor AOX1, o qual é responsável pela maior parte da atividade álcool oxidase da célula.

Caso a inserção de gene heterólogo em *K. phaffii* ocorra na região do promotor AOX2, resulta na redução da capacidade das leveduras metabolizar metanol, passando a ser denominada Mut^S (*Methanol utilization slow*). Porém, se a inserção ocorrer região do promotor AOX1 as leveduras passam a ter capacidade de metabolizar metanol como única fonte de carbono e resulta em células capazes de crescerem bem em meio com metanol. Essas células são denominadas Mut⁺ (*Methanol utilization plus*). A linhagem utilizada de *K. phaffii* foi a selvagem X-33, sendo assim, ela possui o promotor AOX1, então demos prioridades aos transformantes com o padrão Mut⁺, que é observado na PCR por visualização de duas bandas com os tamanhos de 2.200 pb e o tamanho do gene mais 588 pb, provenientes do vetor.

Cada reação de PCR continha: 1X de 10X *Reaction Buffer* (Invitrogen), 3,7 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de dNTPs 10 mmol/L (Invitrogen), 0,8 mmol/L de primer 5' AOX1 *Forward*, 0,8 mmol/L de primer 3' AOX1 *Reverse*, 5-20 ng de DNA, 1,0 U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e água destilada para um volume final de 25 μL. Para a amplificação, foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento do primer a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 4 minutos. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos. Após amplificado, o fragmento foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1%. As transformações que tiveram os padrões de bandas com 2 fragmentos diferentes foram escolhidas para realização da indução uma vez que são determinadas fenotipicamente como Mut⁺.

5.6 Cultivo dos transformantes de *K. phaffii* e análise da produção de proteína heteróloga

Depois de confirmada a transformação de *K. phaffii* por PCR, foi iniciado o cultivo (com a indução da expressão gênica com metanol) para verificar se as proteínas codificadas pelos genes de LPMOs estavam sendo produzidas e secretadas. Esta etapa foi realizada conforme descrito no manual 'EasySelect™ *Pichia Expression Kit*', com adaptações relacionadas à concentração de metanol. O sobrenadante foi coletado e centrifugado para remover as células, permanecendo as proteínas solubilizadas no meio. A confirmação da produção das LPMOs foi feita por *immunoblotting* utilizando anticorpo anti-HisTag e SDS-PAGE com corante Coomassie Blue R-250.

5.7 Análise das proteínas secretadas por *K. phaffii* por SDS-PAGE e *Western Blot*

Após o cultivo em condições indutoras, as amostras do sobrenadante foram avaliadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% e *Western Blot*, para o qual foi utilizado o anticorpo Anti-HisTag (Sigma), uma vez que todas as proteínas foram clonadas *in frame* com a cauda de histidina existente no vetor pPICZαA (Figura 8). A análise de SDS-PAGE e de *Western Blot* foram realizadas de acordo com protocolo de Sambrook e Russel (2001).

5.8 Purificação da proteína heteróloga produzida por *K. phaffii*

A LPMO de *Trichoderma reesei*, clonada em *K. phaffii*, foi expressa fusionada a uma cauda de histidina (His-Tag) na sua extremidade C-terminal, possibilitando etapas de purificação utilizando colunas cromatográficas de afinidade contendo níquel (HisTrap™ HP, 5 mL – GE Healthcare). A purificação foi feita em sistema ÄKTA Pure 28 M1 (GE Healthcare Life Sciences), com coluna HisTrap™ HP.

A proteína marcada com HisTag foi eluída com o tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, imidazol 250 mM) e a fração contendo a enzima recombinante foi dessalinizada e concentrada com a coluna 'Spin Column Protein Concentration 3K' (GE Healthcare), com 20 mM Tampão de fosfato de sódio pH 7,4.

Após a purificação da proteína, foi feita uma diluição do imidazol na amostra purificada, concentrando em Vivaspin 20 (10 kDa MWCO - GE Healthcare) e diluindo com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4.

Após a lavagem em Vivaspin, foi quantificada a proteína purificada através da determinação de proteínas solúveis por espectrofotometria - método BCA da *Thermo*

Scientific. Foi feito também *Western Blot* da proteína purificada a fim de verificar se a purificação ocorreu como previsto.

Primeiramente preparou-se os pontos da curva padrão utilizando as concentrações de 0,05 a 2,0 mg/mL, a solução padrão de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) 2 mg/mL e solução tampão citrato de sódio 0,1 mol/L como diluente. Essas amostras foram homogeneizadas e suas absorbâncias lidas em espectrofotômetro a 562 nm. Para quantificação das proteínas foram utilizadas todas as amostras dos cultivos do biorreator de 1L, Erlenmeyer de 250 mL e 1000 mL, de todos os tempos (0 a 120h). Foram retiradas alíquotas de 25 µL de cada amostra previamente diluída (100 vezes) em microplaca e a cada poço 200 µL do reagente do kit foram adicionados. A microplaca contendo as amostras foi agitada por 30 segundos; incubada a 37°C por 30 min e logo após o seu resfriamento foi feita a leitura no espectrofotômetro a 562 nm.

5.9 Hidrólise enzimática de biomassa vegetal

Pré-tratamento da biomassa vegetal – bagaço de cana-de-açúcar

5.9.1

Para a realização da etapa de hidrólise enzimática utilizando os extratos brutos foi utilizada a biomassa bagaço da cana-de-açúcar, pré-tratada por auto-hidrólise antes da hidrólise enzimática. As condições do pré-tratamento foram: 300 g da biomassa e 3 L de água para a auto-hidrólise do material que ocorreu por 2 horas na temperatura de 180°C em reator Parr (capacidade para 19 L). Para a hidrólise foi determinado o peso seco das biomassas. Aproximadamente 1 g da biomassa foi coletado (em triplicata) em

5.9.2 placas de Petri e levado à estufa por 24 h a 100°C.

Escolha dos fungos para a hidrólise enzimática

Foi realizada a avaliação do efeito da adição da LPMO Cel61a do fungo *T. reesei* produzida por *K. phaffii* em dois extratos brutos enzimáticos na hidrólise de biomassa vegetal. Para isso, foram escolhidos dois fungos, conhecidos como produtores de enzimas β-glicosidases (*Aspergillus aculeatus* F-50) e celulasas (*Trichoderma reesei* ATCC® 60787, Rut-C30), para produzir extratos enzimáticos brutos. Também apresentaram resultados significativos em outros experimentos realizados na Embrapa Agroenergia (dados não apresentados).

Extratos brutos enzimáticos e atividades enzimáticas

Os fungos selecionados foram crescidos em meio nutriente (50 mL), Tabela 2, acrescido de uma fonte de carbono, a borra do dendê (1,250 g). Os fungos cresceram por 5 dias. Em seguida, foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL e centrifugados por 10 minutos a 21952 g e, posteriormente, filtrados a vácuo.

Os extratos brutos foram armazenados em geladeira acrescidos de azida sódica na concentração final 0,2%. Afim de verificar a presença de proteínas foi feita uma quantificação de proteínas totais realizada pela determinação de proteínas solúveis por espectrofotometria - método BCA da *Thermo Scientific*.

Tabela 2 Meio de cultura utilizado para crescimentos dos fungos filamentos selecionados para produção de celulasas totais (FPase) e β -glicosidase.

Componentes	Massa p/ 1L
Uréia	0,30 g
Peptona	0,75 g
Extrato de levedura	0,25 g
(NH₄)₂SO₄	1,4 g
K₂HPO₄	2,0 g
MgSO₄.7H₂O	0,3 g
CaCl₂.2H₂O	0,4 g
ZnSO₄.7H₂O	1,4 mg
FeSO₄.7H₂O	5,0 mg
CoCl₂.6H₂O	2,0 mg
MnSO₄.H₂O	1,04 mg
Borra óleo de dendê (tridecantador)	1,250 g

Atividade de β -glicosidase

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 μ L do extrato enzimático e 100 μ L de celobiose 15 mM (substrato). O branco do substrato foi feito substituindo-se o volume da enzima por tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5.0 e o branco da enzima substituindo-se a celobiose por tampão. A reação foi feita em termociclador por 30 minutos a 50°C, seguido por uma reação de 95°C por 10 minutos (Ghose, 1987). Posteriormente, 2,5 μ L da reação foram transferidos para microplacas do tipo Elisa e

250 μL de reagente Glicose oxidase - Bioclin® foram adicionados. Incubou-se por 10 minutos a 37°C, e finalmente foi feita leitura em espectrofotômetro a 505 nm.

Para o cálculo de atividade, foi realizada uma curva analítica de glicose com 2,5 μL de cada uma das diluições em triplicata da Tabela 3 e 250 μL de Glicose oxidase - Bioclin® em placa Elisa, para posteriormente serem incubados por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foi feita leitura em espectrofotômetro a 505 nm. Uma equação da reta foi obtida ($y = ax + b$), substituindo-se em x os valores de absorbâncias (abs) e y a concentração de glicose. O valor da absorbância de cada ponto corresponde ao valor absoluto de glicose a ser estimado no cálculo de atividade. Uma unidade de β -glicosidase ($\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o substrato para gerar 1 μmol de glicose por minuto.

Tabela 3. Curva analítica de glicose – Beta-glicosidase

Média abs	Glicose total (mg)
0,0022	0
0,0890	0,050
0,1408	0,100
0,2694	0,165
0,3962	0,250

Uma nova curva foi feita a cada novo experimento. Dessa forma, obteve-se a quantidade de glicose (mg) contida em cada um dos ensaios ou controles; o valor obtido para as amostras dos ensaios (mg de glicose), subtrair a quantidade de glicose do branco da enzima e do branco do substrato, obtendo-se então o valor de “glicose real gerada”

Atividade FPase

Foi utilizado o método descrito por Xiao *et al.* (2004). Em placas de 96 poços, foram adicionados 20 μL do extrato enzimático e 40 μL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5.0. Como substrato usou-se discos de papel filtro tipo Whatman®. O branco do substrato foi feito substituindo-se o volume da enzima por tampão, e o branco da enzima sem adição do disco de papel. A reação foi feita em termociclador por 60 minutos a 50°C. Posteriormente, adicionou-se 120 μL de solução de DNS (ácido 3,5 – dinitrosalicílico) e incubou-se em termociclador a 95°C por 10 minutos. Trinta e seis microlitros da reação foram diluídos em 160 μL de água deionizada em placas Elisa, e foi feita leitura em espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda. Para o cálculo de atividade, foi realizada uma curva analítica de glicose (

Tabela 4) com 20 μL das diluições de glicose, 20 μL de solução tampão e 120 μL de DNS em placa de 96 poços, para posteriormente serem incubados em termociclador por 10 minutos a 95°C. Uma alíquota de 36 μL foi diluída em 160 μL de água deionizada em placa Elisa para leitura em espectrofotômetro a 540nm. O valor da

absorbância de cada ponto corresponde ao valor absoluto de glicose a ser estimado no cálculo de atividade. Uma unidade de celulase total (UI.mL⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o substrato para gerar 1 μmol de glicose por minuto. Uma nova curva foi feita a cada duas semanas durante cada novo experimento.

Tabela 4. Curva analítica de glicose – Fpase

Média abs	Glicose total (mg)
0,0010	0
0,0483	0,0400
0,0932	0,0660
0,1535	0,1000
0,2380	0,1340

Planejamento experimental da hidrólise enzimática

5.9.6 O planejamento experimental foi utilizado para avaliar qual proporção de misturas de proteínas acarretará maior liberação de açúcares solúveis nos experimentos de hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas.

O efeito da presença da LPMO em uma proporção de enzima ideal foi avaliado usando um planejamento experimental de mistura *simplex lattice*, utilizando Statistica™ versão 9. O efeito da mistura de extratos brutos de *T. reesei* ATCC® 60787 (Componente A), *A. aculeatus* F-50 (Componente B) e LPMO purificada produzida por *K. phaffii* (Componente C) foi avaliado em função da produção de glicose a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise. O planejamento experimental consistiu em uma série de 10 experimentos, com 3 tratamentos de mistura de duas enzimas, 6 tratamentos de mistura de três enzimas e um ponto central (Tabela 5). A LPMO não foi purificada em quantidades suficientes para serem utilizadas em conjunto com as enzimas celulolíticas, de modo que os componentes A e B foram restritos a valores mínimos em cada experiência ($A \geq 0,2$ e $B \geq 0,2$). Assim, a soma de todos os componentes em misturas foi de 100% com carga total de 50 mg de proteína por 'g' de glucana na biomassa. A liberação de glicose foi aplicada como variável dependente para análise estatística. As previsões do modelo de cada tratamento foram validadas experimentalmente. O modelo proposto foi avaliado por ANOVA e F-test. O significado estatístico foi relacionado com um $F_{(cal)} > F_{(tab)}$.

Tabela 5. Matriz de planejamento de mistura para *simplex lattice* e efeito quadrático, inseridas as restrições, para hidrólise enzimática de biomassas vegetais com misturas de extratos fúngicos. A: extrato bruto de *Trichoderma reesei* ATCC® 60787. B: extrato bruto de *Aspergillus aculeatus* F-50 e C: LPMO-TrCel61A purificada produzida por *K. phaffii*.

	A	B	C
1	0,8	0,2	0
2	0,2	0,8	0
3	0,2	0,2	0,6
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0,2	0,3
6	0,2	0,5	0,3
7	0,6	0,3	0,1
8	0,3	0,6	0,1
9	0,3	0,3	0,4
10	0,4	0,4	0,2

Foi avaliada duplicata dos experimentos 8, 9 e 10 para estimativa da variabilidade da análise. Estas foram consideradas individualmente nos planejamentos. Os resultados experimentais foram analisados no software Statistica® 7.0, para todos os casos foi considerado um nível de significância $p > 10\%$.

A hidrólise ocorreu com 0,8 g de biomassa úmida pré-tratada, sendo assim foi possível fazer os cálculos do volume utilizado de cada extrato bruto em relação ao resultado do BCA dado em mg/mL para padronizar a hidrólise que foi realizada utilizando 5% de sólidos totais + 12,5 mg de proteínas. Para isso, o volume final da hidrólise foi completado com tampão citrato de sódio/ácido cítrico 100 mM pH 5.0 baseado na quantidade de amostra seca do material utilizada na hidrólise. A hidrólise foi feita em placas *deepwell* de 24 poços com agitação de 7 g e a 50°C.

Foi feita uma mistura enzimática com 3 componentes no planejamento sendo os componentes A e B o extrato enzimático de *T. reesei* e de *A. aculeatus*, respectivamente, e o componente C a LPMO-TrCel61A purificada. A hidrólise foi conduzida por 24 h, em triplicata, sendo coletados o tempo 0 h e o tempo 24 h. A leitura de glicose liberada foi feita pelo método enzimático colorimétrico com a glicose monoreagente (Bioclin®), e analisando-se em leitor (Molecular Devices).

Validação do planejamento experimental

Com o planejamento experimental, foi possível prever qual foi a melhor proporção de misturas para os 3 componentes e prever a quantidade de glicose que será liberada para essa mistura. Para validar o planejamento experimental foi feita hidrólise enzimática com as 3 misturas enzimáticas, em triplicata, com as mesmas condições de temperatura e agitação utilizando-se apenas a relação das misturas que foram previstas.

A leitura da glicose liberada foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês: *High performance liquid chromatography*, HPLC - Agilent Infinity 1260) seguindo as seguintes condições: Detector: RID; Coluna: Aminex HPX-87H (BioRad); Temperatura da coluna: 45 °C; Fase móvel: H₂SO₄ 5 mM; Fluxo: 0,6 mL/min.

Cinética de hidrólise enzimática

Após a validação foi realizada a cinética de hidrólise enzimática, os experimentos foram realizados em triplicada e por 48 horas, alíquotas foram retiradas no tempo 0, 4, 8, 24 e 48 horas. Foram feitas 5 hidrólises enzimáticas padronizadas com 5% de sólidos totais + 12,5 mg de proteínas:

- Hidrólise 1: Componente A (Extrato bruto de *T. reesei*) + Componente B (Extrato bruto de *A. aculeatus*) acrescido de 2mg de LPMO-TrCel61A purificada.
- Hidrólise 2: Componente A (Extrato bruto de *T. reesei*) + Componente B (Extrato bruto de *A. aculeatus*).
- Hidrólise 3: Celluclast 1.5L (Novozymes)
- Hidrólise 4: Cellic CTec2 (Novozymes)
- Hidrólise 5: Cellic CTec3 (Novozymes)

As alíquotas foram analisadas em HPLC sob as mesmas condições apresentadas no item 5.9.7, porém, além da glicose também foram analisados celobiose e xilose liberadas.

6 REFERÊNCIAS

AGGER, J. W. et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 6287-6292, 2014. ISSN 0027-8424.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010. ISSN 1754-6834.

BENNATI-GRANIER, C. et al. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 90, 2015. ISSN 1754-6834.

BEY, M. et al. Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (family GH61) from *Podospora anserina*. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 2, p. 488-496, 2013. ISSN 0099-2240.

BUSK, P. K.; LANGE, L. Classification of fungal and bacterial lytic polysaccharide monooxygenases. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 368, 2015. ISSN 1471-2164.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009. ISSN 0008-6215.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005. ISSN 1471-0072.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of molecular recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-138, 2005. ISSN 1099-1352.

DOI, R. H.; KOSUGI, A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 541-551, 2004. ISSN 1740-1526.

DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1485-1499, 2017. ISSN 1751-7915.

EIBINGER, M. et al. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35929-35938, 2014. ISSN 0021-9258.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2007. ISSN 1677-0420.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987. ISSN 1365-3075.

GOODELL, B. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. In: (Ed.): ACS Publications, 2003. ISBN 1947-5918.

GUILLÉN, F. et al. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195-204, 2005.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of pectin. **Plant physiology**, v. 153, n. 2, p. 384-395, 2010. ISSN 1532-2548.

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-3316, 2010. ISSN 0006-2960.

HEMSWORTH, G. R. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases in biomass conversion. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 747-761, 2015. ISSN 0167-7799.

HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009. ISSN 0960-8524.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007. ISSN 0036-8075.

HOLTZAPPLE, M. et al. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 3, p. 275-287, 1990. ISSN 1097-0290.

HU, J. et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, n. 7, p. 2308-2315, 2014.

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. ISSN 0021-9258.

KITTL, R. et al. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 79, 2012. ISSN 1754-6834.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009. ISSN 1754-6834.

KUBICEK, C. P. The Plant Biomass. In: (Ed.). **Fungi and Lignocellulosic Biomass**: Wiley-Blackwell, 2012. p.1-28. ISBN 9781118414514.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Strong cellulase inhibition by Mannan polysaccharides in cellulose conversion to sugars. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 7, p. 1341-1353, 2014. ISSN 1097-0290.

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. ISSN 0099-2240.

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013. ISSN 1754-6834.

LI, J. et al. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 174, 2013. ISSN 1754-6834.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006. ISSN 0175-7598.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002. ISSN 1092-2172.

MAEDA, R. N. et al. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 38-44, 2013. ISSN 0168-1656.

MOHANRAM, S. et al. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 1, p. 15, 2013. ISSN 2043-7129.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008. ISSN 1369-5266.

MOHR, A.; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy policy**, v. 63, p. 114-122, 2013. ISSN 0301-4215.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005. ISSN 0960-8524.

MUKTHAM, R. et al. A Review on 1st and 2nd Generation Bioethanol Production-Recent Progress. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 6, n. 03, p. 72, 2016.

POINTING, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 20-33, 2001. ISSN 0175-7598.

QUINLAN, R. J. et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079-15084, 2011. ISSN 0027-8424.

ROSE, J. K.; SALADIÉ, M.; CATALÁ, C. The plot thickens: new perspectives of primary cell wall modification. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 296-301, 2004. ISSN 1369-5266.

SAMBROOK, J. R.; RUSSEL, D. DW 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2001.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263-289, 2010. ISSN 1543-5008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002. ISSN 0960-8524.

TANGHE, M. et al. Recombinant expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Pichia pastoris*: optimizing yield and N-terminal processing. **Molecular biotechnology**, v. 57, n. 11-12, p. 1010-1017, 2015. ISSN 1073-6085.

TSCHOPP, J. F. et al. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic acids research**, v. 15, n. 9, p. 3859-3876, 1987. ISSN 0305-1048.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000. ISSN 0960-8524.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 219-222, 2010. ISSN 0036-8075.

WANG, W. et al. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 16-27, 2014. ISSN 1369-703X.

WESTERENG, B. et al. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. **Scientific reports**, v. 5, p. 18561, 2015. ISSN 2045-2322.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource technology**, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, 2005. ISSN 0960-8524.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004. ISSN 1097-0290.

ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 27, p. 38-45, 2014. ISSN 0958-1669.

ZHANG, Y.; LIU, R.; WU, X. The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Annals of microbiology**, v. 57, n. 4, p. 553-560, 2007. ISSN 1590-4261.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004. ISSN 1097-0290.

7 PRODUÇÃO DE MONO-OXIGENASE LÍTICA DE POLISSACARÍDEO DE *TRICHODERMA REESEI* (TRCEL61A) POR *KOMAGATAELLA PHAFFII* E SEU EFEITO NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA PRÉ-TRATADA

Observação: resultados experimentais descritos no formato de artigo científico a ser submetido em revista indexada com fator de impacto relevante e qualis mínimo B1.

Resumo

As mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) são enzimas de atividade oxidativa, as quais têm sido o foco de diversos estudos como elementos auxiliares de celulases e hemicelulases na conversão de coprodutos e resíduos lignocelulósicos. Esses materiais podem ser oriundos da agroindústria e, pela ação das enzimas são convertidos em monômeros de hexose e pentoses, que podem ser utilizados em processos fermentativos para obtenção de álcoois (p.ex: etanol) e outros bioprodutos. Neste trabalho, uma LPMO de *Trichoderma reesei* (LPMO-TrCel61A) foi produzida com sucesso pela levedura *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). A LPMO-TrCel61A foi utilizada como modelo, e adicionalmente cinco novas LPMOs de Basidiomycota e Ascomycota foram selecionadas a partir do banco de dados CAZy para serem clonadas em vetor de expressão de *K. phaffii* (pPICZalphaA). Os resultados mostraram que *K. phaffii* foi transformada com os 6 genes de LPMOs de fungos, porém a produção heteróloga foi observada apenas para a LPMO de *T. reesei* (TrCel61A). As enzimas purificadas obtidos do cultivo de *K. phaffii* (LPMO-TrCel61A) foram aplicados na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise, como aditivo aos extratos brutos contendo enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* RUT-C30 e *Aspergillus aculeatus* F-50. A adição da LPMO-TrCel61A junto aos dois extratos brutos fúngicos promoveu aumento significativo (cerca de 70%) na liberação de glicose quando comparado com os extratos utilizados individualmente (sem LPMO-TrCel61A) ou contendo enzimas comerciais.

Palavras-chave: LPMO, *Komagataella phaffii*, Enzimas auxiliares, hidrólise enzimática, glicose.

7.1 Introdução

À medida que tem aumentado o consumo de fontes energéticas no mundo, há uma crescente preocupação com a disponibilidade em longo prazo dos combustíveis fósseis, uma vez que são fontes de energia não renováveis. Com isso, substituir os combustíveis fósseis ou aumentar a disponibilidade de combustíveis utilizando fontes de energia renováveis é um desafio, que tem levado à implementação de novas estratégias de produção, como o uso de material de origem vegetal para a obtenção de biocombustíveis. A produção de biocombustíveis utiliza matérias-primas como o milho, a cana-de-açúcar e a beterraba, podendo causar conflito de interesse entre a produção de alimento e a produção de biocombustíveis (MOHANRAM *et al.*, 2013), principalmente, em regiões com pouca disponibilidade de terras agricultáveis, como na Europa, por exemplo.

Diversas pesquisas têm voltado a atenção para o melhor aproveitamento na produção de biocombustíveis. As pesquisas têm voltado a sua atenção para a produção de biocombustíveis de segunda geração (2G), que pode ser um ponto de integração com setor de produção de alimentos. Para produção do etanol de segunda geração (E2G), por exemplo, pode-se utilizar de matéria-prima proveniente das biomassas da agricultura ou mesmo dos coprodutos lignocelulósicos gerados na produção do E1G (MUKTHAM *et al.*, 2016). Os materiais lignocelulósicos, provenientes de herbáceas, madeira dura e madeira macia, são as principais matérias-primas utilizadas para a produção de biocombustíveis líquidos, particularmente o etanol (DOI;KOSUGI, 2004). Porém, para disponibilizar açúcares simples e permitir a fermentação, é necessário superar a recalcitrância da parede celular (HIMMEL *et al.*, 2007; BENNATI-GRANIER *et al.*, 2015).

As celulasas são as principais enzimas que participam na desconstrução da lignocelulose, hidrolisando a ligação glicosídica β -1,4 entre as moléculas de D-glicose. (MAEDA *et al.*, 2013). No entanto, a conversão dos componentes macromoleculares dos materiais lignocelulósicos depende da interação de diversos tipos de enzimas, tais como: celulasas, hemicelulasas, ligninases e pectinases. Recentemente, tem sido reportado um grupo de enzimas auxiliares chamadas mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO), as quais possuem atividade oxidativa e interagem sinergicamente com as enzimas hidrolíticas para facilitar a despolimerização da celulose (ISAKSEN *et al.*, 2014) ou hemicelulose.

Existe uma grande diversidade catabólica entre os microrganismos que usam enzimas como mecanismo para a utilização de materiais lignocelulósicos como fonte nutritiva. Essas enzimas têm sido caracterizadas ao longo do tempo e muitas possuem potencial para serem utilizadas na obtenção de diversos bioprodutos derivados de biomassas vegetais, as chamadas biorrefinarias. Porém, os processos metabólicos e crescimento de alguns microrganismos produtores de enzimas de interesse é relativamente lento, sendo um gargalo na aplicação em escala industrial. Nesse aspecto, essas enzimas têm sido produzidas em hospedeiros heterólogos com crescimento rápido, tais como bactérias e leveduras, como alternativa para obtenção de quantidades suficientes da proteína para caracterização bioquímica e aplicação biotecnológica (LYND *et al.*, 2002; DALY; HEARN, 2005). Deste modo, este trabalho teve como objetivo produzir a LPMO TrCel61A do fungo *Trichoderma reesei* na levedura *K. phaffii* e aplicar essa proteína auxiliar em misturas com enzimas fúngicas (extratos brutos) para realização de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

7.2 Material e métodos

7.2.1 Seleção e síntese de LPMO de *Trichoderma reesei*

A seleção do gene codificador da LPMO de *Trichoderma reesei* (TrCel61A) (GenBank Y1113) foi realizada utilizando as bases de dados de domínio público CAZY (*Carbohydrate-Active enZYmes Database*) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A sequência do peptídeo sinal nativo para secreção da proteína foi retirada do gene, uma vez que se optou por utilizar a sequência sinal existente no vetor de *Komagataella phaffii*, (denominada α -factor, de *Saccharomyces cerevisiae*) (Life Technologies). Após a remoção do peptídeo sinal nativo, a sequência foi analisada utilizando o programa Geneious versão 7.1.8. e foi necessário adicionar dois nucleotídeos antes do sítio da enzima de restrição *Xba*I, para garantir a clonagem do gene em *frame* (tradução correta das proteínas) com a cauda de histidina na região C-terminal do vetor pPICZ α A. As sequências foram avaliadas na plataforma *GeneArt* (Life Technologies), e, posteriormente, foram sintetizadas e clonadas em vetor de expressão pPICZ α A de *K. phaffii*.

Clonagem e expressão da LPMO de *Trichoderma reesei* (TrCel61A)

Células eletrocompetentes de *E. coli*, cepa DH10B, foram transformadas com o vetor de expressão pPICZ α A, contendo o gene da LPMO TrCel61A. As células foram 7.2.2 plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) ágar, contendo 25 μ g/mL Zeocina (Invitrogen), e crescidas a 37 °C, por 16 a 20 horas. Seis transformantes de *E. coli* foram selecionados e inoculados em 3 mL de meio LB, contendo Zeocina (Invitrogen), e incubados a 4 g, 37 °C, por aproximadamente 20 horas. Após o crescimento das bactérias, a extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit ‘GeneJET Plasmid Miniprep Kit’ (Thermo Scientific). A transformação foi checada por análise do padrão de restrição do plasmídeo recombinante com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* (New England BioLabs).

Após confirmar a transformação de *E. coli*, a extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit ‘QIAGEN Plasmid Midi Kit’ (Qiagen). Aproximadamente 10 μ g do vetor pPICZ α A contendo o gene TrCel61A foram linearizados com a enzima de restrição *SacI* (Thermo Scientific) e células de *K. phaffii* X33 foram transformadas por eletroporação, segundo o manual ‘EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen)’. Placas de YPDS ágar (*Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Medium*) contendo 100 μ g/mL Zeocina foram incubadas a 30°C por 48 h a 72 h.

A integração correta do gene TrCel61A no genoma de *K. phaffii*, isto é, por substituição do gene *aox1* e sob o controle do promotor AOX1 induzível com metanol, foi verificada por PCR com os iniciadores 5'AOX e 3'AOX. Os transformantes de *K. phaffii* foram então triados quanto à produção de proteína por indução com metanol, em meio BMMY (1% de Extrato de Levedura, Peptona 2%, Metanol 0,5%, Tampão Fosfato 100 mM pH 6,0, 1,34% YNB, 4X10⁻⁵% de Biotina), em Erlenmeyer de 250 mL, por 96 horas. A cada 24 horas, o meio foi suplementado com 0,5% (v/v) de metanol e 7.2.3 alíquotas foram retiradas, a cada 24 horas, para posterior análise das proteínas secretadas.

Análise da produção e purificação da LPMO TrCel61A

Após 96 horas de cultivo (indução com metanol), a análise da produção e secreção da proteína heteróloga foi realizada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% (m/v) e *Western Blot*, de acordo com o protocolo descrito no Manual de Transformação de Plantas Genéticas (Embrapa) (BRASILEIRO;CARNEIRO, 1998). Para a purificação de TrCel61A aproximadamente 50 mL do cultivo foram centrifugados a

3.000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi carregado em coluna de purificação de proteína marcada com histidina HisTrap HP (GE Healthcare) (1,60 × 2,50 ou 1,60 × 10 cm), previamente equilibrada com tampão de ligação. O carregamento da proteína foi realizado usando o ÄKTA Pure purifier 100 (GE Healthcare). A proteína marcada com Histag foi eluída com o tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, imidazol 250 mM) e a fração contendo a enzima recombinante foi dessalinizada e concentrada com a coluna 'Spin Column Protein Concentration 3K' (GE Healthcare), com 20 mM Tampão de fosfato de sódio pH 7,4.

Biomassa vegetal

7.2.4 Para a realização da hidrólise com os extratos brutos de fungos foi escolhida a biomassa bagaço da cana-de-açúcar, que foi pré-tratada por auto-hidrólise antes da hidrólise enzimática. As condições do pré-tratamento foram: 300 g da biomassa e 3 L de água para a auto-hidrólise do material que ocorreu por 2 horas na temperatura de 180°C em reator Parr (capacidade para 19 L). O reator foi gradualmente aquecido até atingir 180 °C, para posteriormente, iniciar a reação durante 40 minutos e agitação a 40 g. Uma vez finalizado o tempo de reação, as amostras foram esfriadas e filtradas para retirar a água livre.

7.2.5

Fungos e hidrólise enzimática

A avaliação da atividade enzimática da LPMO *TrCel61A* foi realizada por meio de análise do efeito de sua adição a outros 2 extratos brutos de fungos na hidrólise enzimática em uma biomassa vegetal. Para isso, foram escolhidos dois fungos, um rico em enzimas β-glicosidases e outro em celulases totais, para produzir extratos enzimáticos brutos. Os fungos selecionados foram o *Trichoderma reesei* ATCC® 60787

7.2.6 (Rut-C30) e o *Aspergillus aculeatus* F-50. Ambos foram selecionados a partir de dados obtidos de atividades enzimáticas em experimentos na Embrapa Agroenergia.

Extratos brutos enzimáticos e atividades enzimáticas

Os extratos brutos foram obtidos em fermentação submersa dos fungos *T. reesei* ATCC® 60787 e *A. aculeatus* F-50. Culturas fúngicas continham 5% (m/v) da borra do dendê e meio nutriente (extrato de levedura 0.3 g/L; peptona 0.75 g/L; ureia 4.99 mM;

(NH₄)₂SO₄ 10.59 mM; MgSO₄.7H₂O 1.22 mM; CaCl₂.2H₂O 3.100 mM; ZnSO₄.7H₂O 4.86 μM; FeSO₄.7H₂O 17.98 μM; CoCl₂.6H₂O 8.40 μM; MnSO₄.H₂O 6.15 μM; Mandels & Weber, 1969).

Em frascos de 250 mL, foram inoculados 5 discos com micélio do fungo (5 mm de diâmetro) em 50 mL do meio nutriente para cada linhagem, independentemente. As amostras foram incubadas a 28°C e 3 g por 5 dias. Extratos brutos foram obtidos através da filtração a vácuo e centrifugação a 900 g, e posteriormente, adicionado 0,03 mM de azida sódica para evitar contaminação.

As atividades de FPase, xilanase e β-glicosidase foram medidas em ensaios colorimétricos. As atividades de FPase e xilanase consistiram em medir os açúcares redutores liberados após a reação de extratos brutos com papel de filtro Whatman® e xilana de madeira de faia 1% (m / v), respectivamente, a 50 °C por 60 minutos. A quantidade de açúcares redutores foi quantificada pela reação do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e medida a 540 nm em espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices) (GHOSE, 1987; XIAO *et al.*, 2004). A β-glicosidase foi determinada por liberação de glicose a partir de celobiose 200 mM e hidrólise de extratos brutos a 50 °C durante 30 minutos. A concentração de glicose foi determinada pelo método GODPOD (Bioclin®) e medida a 505 nm (Adney & Baker, 1996; Ghose, 1987). Uma unidade de atividade enzimática (U / mL) foi definida como a quantidade de enzimas que hidrolisam o substrato específico para gerar um μmol de açúcares por minuto.

Para quantificar as proteínas totais, foi realizada a determinação de proteínas solúveis por espectrofotometria através do método do ácido bicinconinico (BCA) da *Thermo*

7.2.7 *Fisher Scientific Pierce*TM.

Planejamento experimental

O efeito da presença da LPMO em uma proporção de enzima ideal foi avaliado usando um planejamento experimental de mistura *simplex lattice*, utilizando StatisticaTM versão 9. O efeito da mistura de extratos brutos de *T. reesei* ATCC® 60787 (Componente A), *A. aculeatus* F-50 (Componente B) e LPMO purificada produzida por *K. phaffii* (Componente C) foi avaliado em função da produção de glicose a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise. O planejamento experimental consistiu em uma série de 10 experimentos, com 3 tratamentos de mistura de duas enzimas, 6 tratamentos de mistura de três enzimas e um ponto central (Tabela 6). A

LPMO não foi purificada em quantidades suficientes para serem utilizadas em conjunto com as enzimas celulolíticas, de modo que os componentes A e B foram restritos a valores mínimos em cada experiência ($0,2 \leq A \leq 0,8$ e $0,2 \leq B \leq 0,8$) (Figura 10). Assim, a soma de todos os componentes em misturas foi de 100% com carga total de 50 mg de proteína por 'g' de glucana na biomassa. A liberação de glicose foi aplicada como variável dependente para análise estatística. As previsões do modelo de cada tratamento foram validadas experimentalmente. O modelo proposto foi avaliado por ANOVA e F-test. O significado estatístico foi relacionado com um $F_{(cal)} > F_{(tab)}$.

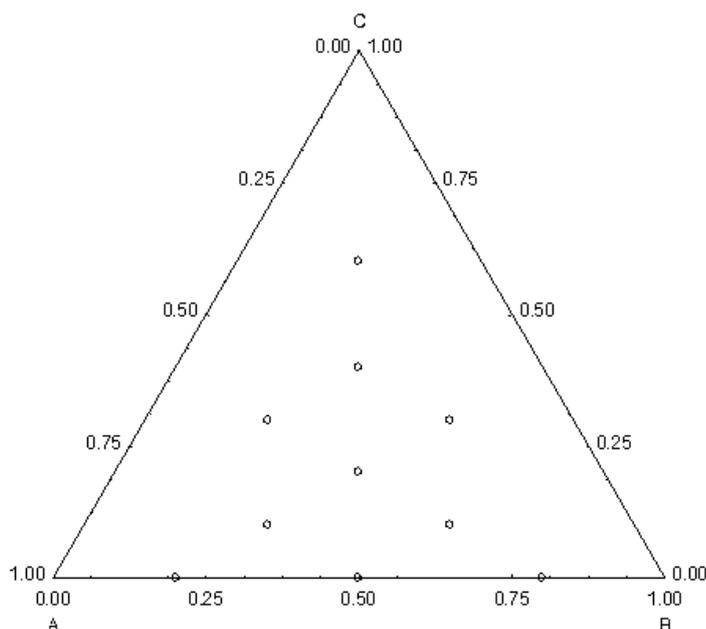


Figura 10. Diagrama ternário com as novas regiões de busca após as restrições no planejamento experimental. Vértice A: *T. reesei* ATCC® 60787. Vértice B: *A. aculeatus* F-50. Vértice C: LPMO purificada produzida por *K. phaffii*

A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em placas deepwell de 24 poços. Em cada poço foi adicionado bagaço de cana-de-açúcar a 5% (m/v). Foram adicionados extratos brutos de *T. reesei* ATCC® 60787, *A. aculeatus* F-50 e LPMO TrCel61A numa concentração total de proteína de 50 mg/mL. As proteínas foram determinadas usando o kit de teste de proteína *BCA Pierce™* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A reação foi realizada a pH 5,0 (tampão de citrato de sódio/ácido cítrico), 50 °C e 7 g durante 24 horas. As alíquotas dos pontos 0 h e 24 h foram centrifugadas a 1400 g durante 5 minutos. A concentração de glicose foi determinada em HPLC (Agilent 1260 Infinity) de acordo com as seguintes condições:

Detector: RID; Coluna: Aminex HPX-87H (BioRad); temperatura: 45 ° C; Fase móvel: H₂SO₄ 5 mM; Fluxo: 0,6 ml/min.

Cinética enzimática na hidrólise

Após a validação, foi realizada a cinética de hidrólise enzimática, na qual os experimentos foram realizados em triplicada e por 48 horas, e alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 4, 8, 24 e 48 horas. Foram realizadas outras 3 hidrólises com enzimas comerciais para comparar o rendimento das hidrólises: Cellulase de *Aspergillus niger*, Cellic® CTec2 e Cellic® CTec3.

Com isso, no total foram 5 experimentos de cinética de hidrólise enzimática padronizadas com 5% de sólidos totais + 12,5 mg de proteínas:

- Hidrólise 1: Componente A (Extrato bruto de *T. reesei*) + Componente B (Extrato bruto de *A. aculeatus*) acrescido de 2 mg de LPMO purificada.
- Hidrólise 2: Componente A (Extrato bruto de *T. reesei*) + Componente B (Extrato bruto de *A. aculeatus*) e sem LPMO.
- Hidrólise 3: Celluclast 1.5L (Novozymes)
- Hidrólise 4: Cellic CTec2® (Novozymes)
- Hidrólise 5: Cellic CTec3® (Novozymes)

As alíquotas foram analisadas em HPLC sob as mesmas condições da hidrólise enzimática, e foi analisada a glicose liberada.

7.3 Resultados e discussão

Clonagem, expressão e purificação da proteína TrCel61A

A clonagem do gene TrCel61A em *K. phaffii* linhagem X33 foi confirmada por PCR, e vários transformantes foram cultivados com metanol durante 96 horas. Para confirmar a produção e secreção da proteína heteróloga, o sobrenadante da cultura e a proteína purificada foram analisados em géis SDS-PAGE a 12% e *Western blot*. Uma proteína foi detectada com massa molecular de 60 kDa (Figura 11 A e 11 B), que é maior que a massa calculada de 35 kDa, provavelmente devido à glicosilação. No entanto, não parece interferir na sua função, conforme demonstrado no trabalho de Tanghe *et al.* (2015). A proteína TrCel61A purificada (Figura 11 C) foi utilizada em experimentos de hidrólise de biomassa.

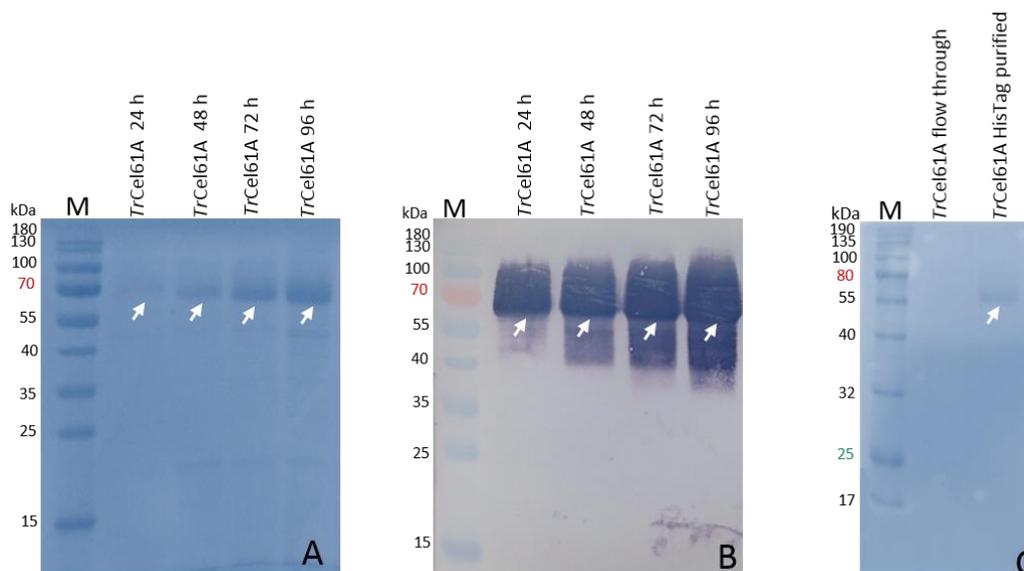


Figura 11. Análise por SDS-PAGE e Western Blot do sobrenadante e da proteína purificada TrCel61A após 96 horas de indução em *K. phaffii*. A) Sobrenadante da indução após 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo (linhas 1 a 4); B) Membrana de nitrocelulose marcada com anticorpo Anti-HisTag. As amostras estão na mesma ordem que (A). M - PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific). C) Proteína TrCel61A após a purificação por coluna de afinidade HisTag (linha 2). A linha 1 mostra o sobrenadante após ser passado pela coluna (flow-through). As setas indicam a proteína alvo. M) *Color Prestained Protein Standard* (New England Biolabs®).

7.3.2 Atividade enzimática dos extratos brutos do *Trichoderma reesei* e *Aspergillus aculeatus*.

Na Figura 12 são apresentados os resultados das atividades enzimáticas (U/mL) FPase, xilanase e B-glicosidase dos extratos brutos provenientes dos fungos *T. reesei* e *A. aculeatus*. *A. aculeatus* F-50 apresentou menor atividade de FPase e maior atividade β -glicosidase que o *T. reesei* ATCC® 60787, como já era esperado desde o planejamento em função das citações de literatura (HASUNUMA *et al.*, 2013; MORANT, 2014; HUANG *et al.*, 2016; NAKAZAWA *et al.*, 2016). Ambos os fungos possuem atividade de xilanase.

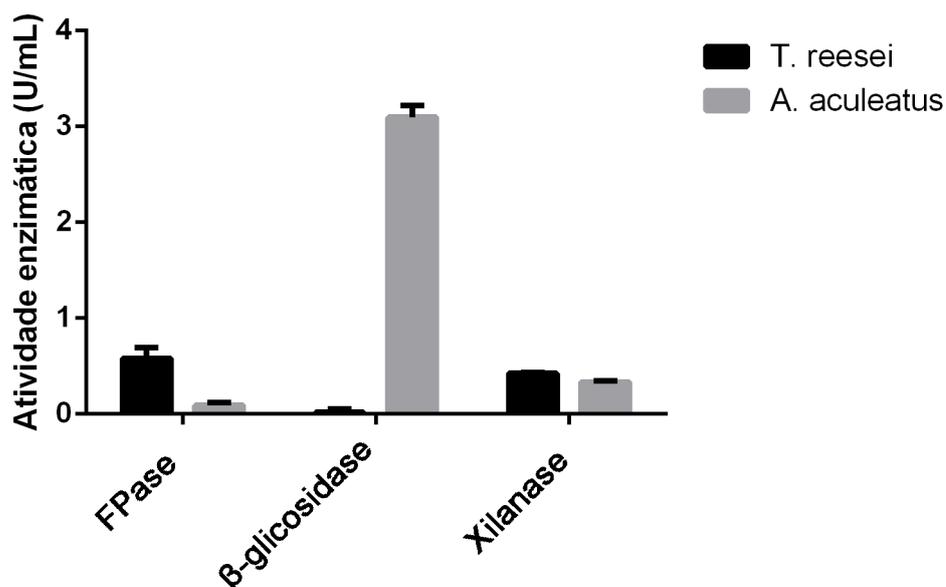


Figura 12. Atividades de FPase (celulases totais), β -glicosidase e xilanase dos extratos brutos obtidos na fermentação submersa de *T. reesei* ATCC® 60787 e *A. aculeatus* F-50.

7.3.3 Combinações de enzimas (extratos brutos) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

A composição enzimática ideal na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise foi analisada usando um planejamento experimental de misturas de extratos brutos e LPMO-TrCel61A. As misturas foram feitas usando os extratos celulolíticos de *T. reesei* (TR) e *A. aculeatus* (AA) como principais componentes e extrato de LPMO-TrCel61A purificado como componente enzimático acessório. Os dados de resposta da liberação de glicose na hidrólise foram analisados por regressão (CI > 90%) do modelo quadrático linear completo. Em todos os experimentos, o modelo quadrático foi encontrado como o modelo mais adequado para a liberação de glicose. A concentração de glicose de três experimentos é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6. Matriz de misturas de extratos brutos enzimáticos e concentração de glicose após hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise. *T. reesei* (TR); *A. aculeatus* (AA); LPMO (LPMO-TrCel61A).

Experimentos	Pseudo-componentes			Concentração de Glicose (g/L) gerada pela mistura TR+AA+LPMO
	A	B	C	
1	0,8	0,2	0	5,577
2	0,2	0,8	0	4,453
3	0,2	0,2	0,6	2,423
4	0,5	0,5	0	5,678
5	0,5	0,2	0,3	4,259
6	0,2	0,5	0,3	3,417
7	0,6	0,3	0,1	5,727
8	0,3	0,6	0,1	4,267
9	0,3	0,3	0,4	2,703
10	0,4	0,4	0,2	4,911

Na mistura (TR + AA + LPMO) a regressão foi significativa utilizando um modelo quadrático ($R^2 = 89,34\%$), após a remoção de interações não significativas TR-LPMO e AA-LPMO. O valor $F(\text{cal})$ foi de 27,93, enquanto $F(\text{tab})$ foi de 2,728 com 90% de intervalo de confiança, indicando que a regressão descreveu os dados experimentais. A interação de *T. reesei* e *A. aculeatus* foi relacionada com a maior concentração de glicose após a hidrólise enzimática. A equação para o rendimento relativo da glicose com base na quantidade do componente é deduzida como:

$$\text{Glicose} = 7,739.\text{TR}.\text{AA} + 8,167.\text{TR} + 5,634.\text{AA} + 4,643.\text{LPMO} - 3,069 \quad (1)$$

De acordo com o modelo, a maior concentração de glicose é obtida com TR = 0,664 e AA = 0,336. Nessa condição, o modelo deduziu uma concentração de glicose de 5,97 g/L. A validação experimental nestas condições foi de 5.262 g/L, sendo ligeiramente inferior ao valor previsto (5.567%).

De um modo geral, o experimento mostrou maior concentração de glicose em ambos os valores previstos e validação experimental, do que quando utilizou-se apenas componentes TR e AA. Além disso, a LPMO purificada não mostrou um efeito negativo na liberação de glicose, mas também não teve efeito significativo na produção máxima de glicose.

Assim, resolveu-se propor outra abordagem com base na hipótese de que o aumento da concentração protéica da enzima auxiliar LPMO em 0,2 mg na mistura com maior concentração de glicose (TR = 0,664 e AA = 0,336), poderia aumentar a liberação de glicose após a hidrólise. A influência deste ensaio sob esta condição é representada na Figura 13. A adição de LPMO-TrCel61A na mistura enzimática ideal aumenta a conversão de celulose até 18,35%. Estes dados indicaram que o LPMO-TrCel61A tem um efeito positivo maior na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, aumentando a conversão bioquímica de extratos celulolíticos de *T. reesei* e *A. aculeatus* quando adicionada como enzima acessória em misturas enzimáticas ideais, tais resultados se assemelham com os trabalhos de Müller *et al.* (2015). Ou seja, quando reduzimos FPases e β -glicosidases, que são as enzimas que tem uma atuação maior na degradação da biomassa, e acrescentamos mais LPMO, essa redução não é compensado pela adição de LPMO. Por se tratar de uma enzima acessória, para estudos futuros, seria melhor fazer um planejamento experimental apenas com as FPases e β -glicosidases. Ao se chegar à uma mistura ideal destas enzimas o próximo passo seria adicionar durante a hidrólise diferentes concentrações de LPMO, sendo assim seria possível ter mais conclusões, como carga máxima de LPMO que poderia ser adicionada e se a LPMO possa a vir causar inibições ou perda de efetividade.

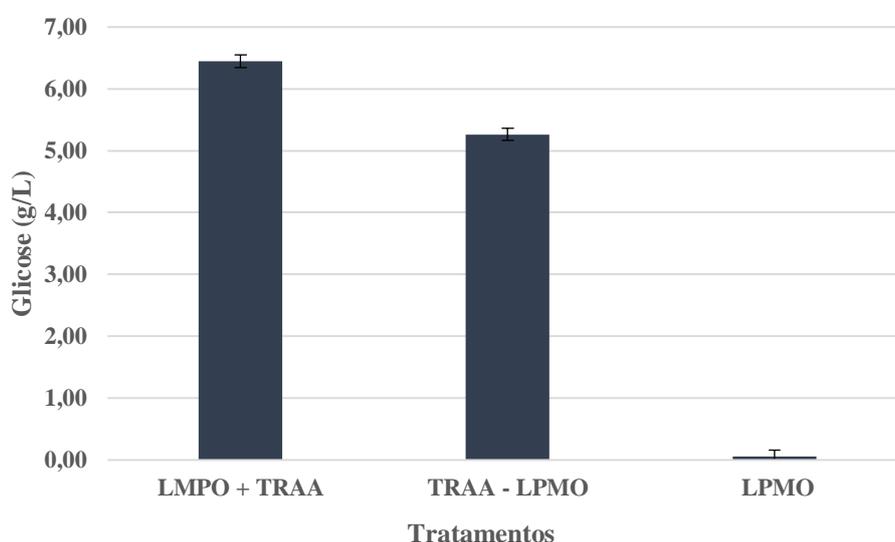


Figura 13. Concentração de glicose após hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar usando concentração ótima de enzima (TR + AA) e enzima acessória LPMO-TrCel61A. Legenda: LMPO+TRAA: *T. reesei/A. aculeatus* com extrato de LPMO-TrCel61A; TRAA-LMPO: *T. reesei/A. aculeatus* sem extrato de LPMO-TrCel61A; LMPO: Adicionando apenas LPMO-TrCel61A.

Perfil de hidrólise enzimática

A validação do perfil enzimático mostrou que o modelo proposto foi estatisticamente satisfatório à liberação de glicose. Com isso, procedeu-se com a cinética da hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar e com as misturas relativas do modelo (66,4% de *T. reesei* e 33,6% de *A. aculeatus*) e 2 mg de LPMO, para efeito de controle foi adicionada água destilada à hidrólise 2, no mesmo volume utilizado de LPMO-TrCel61A na hidrólise 1.

Tabela 7 Glicose gerada das hidrólises conduzidas por até 48 horas no bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise. Hidrólise 1 (Com/LPMO); Hidrólise 2 (Sem/LPMO); Hidrólise 3 (comercial Celluloclast®); Hidrólise 4 (comercial Cellic® Ctec2); Hidrólise 5 (comercial Cellic® Ctec3). As diferenças estatísticas foram realizadas entre as diferentes hidrólises na mesma coluna (representado pelas letras minúsculas) e para os tempos diferentes na mesma hidrólise (representada pelas letras maiúsculas). Letras diferentes possuem diferença estatística no teste ANOVA.

Tempo (h)		0	4	8	24	48
Glicose (g/L)	Hidrólise 1	0,85 ^{aA}	3,87 ^{aB}	5,15 ^{aC}	8,53 ^{aD}	11,61 ^{aE}
	Hidrólise 2	0,82 ^{aA}	1,87 ^{bB}	2,38 ^{bC}	3,09 ^{bC}	3,37 ^{bC}
	Hidrólise 3	0,80 ^{aA}	2,86 ^{cA}	4,03 ^{cC}	6,62 ^{cD}	8,55 ^{cE}
	Hidrólise 4	1,85 ^{aA}	6,84 ^{dB}	9,19 ^{dC}	14,98 ^{dD}	18,16 ^{dE}
	Hidrólise 5	1,66 ^{aA}	9,22 ^{eB}	11,96 ^{eB}	20,14 ^{eD}	23,86 ^{eE}

Na

Tabela 7 pode-se observar a eficiência do coquetel enzimático Cellic Ctec3[®] que liberou mais de 20 g/L de glicose durante 48 horas de hidrólise, essa eficiência de Cellic Ctec3[®] já foi demonstrada por Li *et al.* (2013) que verificou que quanto maior a carga enzimática, maior é a conversão de celulose em glicose, porém essa conversão tem sua velocidade reduzida a partir de 48 horas de hidrólise. Em seguida, como esperado, a Cellic Ctec2[®] teve a segunda maior quantidade de glicose liberada.

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** observa-se que a hidrólise enzimática do modelo proposto teve uma liberação máxima de glicose de 3,37 g/L, muito abaixo do que a validação do modelo proposto, isso provavelmente ocorreu devido ao volume de água adicionado na mistura do experimento 2 para equiparar com o volume utilizado de LPMO do experimento 1, que foi cerca de 10 mL. Esse mesmo volume de água também foi adicionado aos experimentos 3, 4 e 5 para que o percentual

(%) de sólidos totais fosse o mesmo em todos os experimentos e fosse possível inferir resultados paralelos com os resultados de cada experimento.

A quantidade de glicose gerada com a Hidrólise 2 (sem LPMO) foi menor que a quantidade de glicose gerada pela Celluloclast[®] em todos os tempos. Já a quantidade de glicose liberada com a Hidrólise 1 (com LPMO) foi superior em todos os tempos em relação à Celluloclast[®], chegando à 11,61 g/L no período de 48 horas (Tabela 7). Esse resultado mostrou a eficiência da LPMO-TrCel61A, como esperado, superando as expectativas quando comparado com a Celluloclast[®], uma vez que Eibinger *et al.* (2014) mostrou que a LPMO-TrCel61A de fato aumenta a liberação de glicose. Song *et al.* (2018) apresentaram resultados contundentes quanto ao sinergismo entre celulasas e LPMOs. Estes autores analisaram a hidrólise enzimática de celulose (avicel) por meio de microscopia de força atômica em tempo real. Os resultados mostraram acréscimos significativos de glicose quando a LPMO estava presente no coquetel enzimático.

Outros trabalhos (KITTL *et al.*, 2012; EIBINGER *et al.*, 2014) adicionaram um doador de elétrons (como o ascorbato, a celobiose ou ácido gálico) para que a LPMO realizasse a catalise oxidativa da lignocelulose, no entanto no trabalho apresentado, nenhum doador foi adicionado (WESTERENG *et al.*, 2015). Apesar de não ter adicionado nenhum dos doadores de elétrons já reportados, a otimização na conversão da celulose pelas enzimas dos extratos brutos (principalmente celulasas e β -glicosidasas) foi significativa. De acordo com Hu *et al.* (2014) não é necessário uma fonte exógena redutora para doar elétrons para LPMO quando a hidrólise ocorre em um substrato lignocelulósico, porque aparentemente, alguns componentes solúveis como a lignina, liberada durante o pré-tratamento podem fazer uma reação redox. Westereng *et al.* (2015) confirmam que a lignina pode sim atuar doando elétrons para a LPMO. Além disso, foi utilizado um extrato bruto proveniente de *T. reesei* e é sabido que o *T. reesei* possui genes que codificam LPMO (AA9), sendo assim é muito provável que este fungo tenha secretado fontes naturais doadoras de elétrons (DRUZHININA;KUBICEK, 2017).

7.4 Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível confirmar a produção de uma LPMO modelo previamente caracterizada do fungo *T. reesei*, utilizando-se o sistema de expressão de *K. phaffii* também já realizada por Karlsson *et al.* (2001).

Apesar de não ter sido possível confirmar a atividade enzimática da LPMO- TrCel61A em substratos sintéticos (dados não apresentados) ou com a captação de oxigênio

liberada pelo Amplex red/Horseradish Peroxidase (dados não apresentados) o resultado da hidrólise enzimática mostrou que de fato a LPMO-TrCel61A auxilia de alguma forma a formação de glicose dos complexos enzimáticos dos extratos brutos dos fungos *T. reesei* e *A. aculeatus* (aumentando cerca de 18,35% quando utilizado LPMO junto com os extratos brutos). Uma observação que pode ser feita é que a LPMO é proveniente do mesmo fungo utilizado como fonte de celulases totais, o *T. reesei*, com isso é possível haver alguma molécula (não necessariamente um doador de elétron) liberada pelo fungo que esteja deixando a enzima ativa durante a hidrólise.

O fato de não adicionar um doador de elétron na hidrólise e ainda assim a LPMO aumentar significativamente a conversão da celulose, corrobora com os estudos já realizados que afirmam a possibilidade da lignina (ou resíduos) estarem agindo como doador de elétrons. Quando comparados com as enzimas comerciais como Cellic® Cetec2 e Cetec3, a adição de apenas a LPMO não torna viável a formação de um coquetel enzimático ideal, porém, com este trabalho, esperamos em conjuntos com outros colaboradores elaborar um coquetel capaz de ter um custo-benefício suficiente para produção em larga escala de etanol de segunda geração.

7.5 Referências

AGGER, J. W. et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 6287-6292, 2014. ISSN 0027-8424.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010. ISSN 1754-6834.

BENNATI-GRANIER, C. et al. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 90, 2015. ISSN 1754-6834.

BEY, M. et al. Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (family GH61) from *Podospora anserina*. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 2, p. 488-496, 2013. ISSN 0099-2240.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. D. C. Manual de transformação genética de plantas. **Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen**, 1998.

BUSK, P. K.; LANGE, L. Classification of fungal and bacterial lytic polysaccharide monooxygenases. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 368, 2015. ISSN 1471-2164.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009. ISSN 0008-6215.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005. ISSN 1471-0072.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of molecular recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-138, 2005. ISSN 1099-1352.

DOI, R. H.; KOSUGI, A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 541-551, 2004. ISSN 1740-1526.

DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1485-1499, 2017. ISSN 1751-7915.

DUTTA, S.; WU, K. C.-W. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 4615-4626, 2014.

EIBINGER, M. et al. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35929-35938, 2014. ISSN 0021-9258.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2007. ISSN 1677-0420.

FUSHINOBU, S. Metalloproteins: a new face for biomass breakdown. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 88, 2014. ISSN 1552-4469.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987. ISSN 1365-3075.

GOODELL, B. Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. In: (Ed.): ACS Publications, 2003. ISBN 1947-5918.

GUILLÉN, F. et al. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195-204, 2005.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of pectin. **Plant physiology**, v. 153, n. 2, p. 384-395, 2010. ISSN 1532-2548.

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-3316, 2010. ISSN 0006-2960.

HASUNUMA, T. et al. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource technology**, v. 135, p. 513-522, 2013. ISSN 0960-8524.

HEMSWORTH, G. R. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases in biomass conversion. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 747-761, 2015. ISSN 0167-7799.

HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009. ISSN 0960-8524.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007. ISSN 0036-8075.

HOLTZAPPLE, M. et al. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 3, p. 275-287, 1990. ISSN 1097-0290.

HU, J. et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, n. 7, p. 2308-2315, 2014.

HUANG, J.-W. et al. Crystal structure and genetic modifications of FI-CMCCase from *Aspergillus aculeatus* F-50. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 478, n. 2, p. 565-572, 2016. ISSN 0006-291X.

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. ISSN 0021-9258.

KARLSSON, J. et al. Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. **European journal of biochemistry**, v. 268, n. 24, p. 6498-6507, 2001. ISSN 0014-2956.

KITTL, R. et al. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 79, 2012. ISSN 1754-6834.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009. ISSN 1754-6834.

KUBICEK, C. P. The Plant Biomass. In: (Ed.). **Fungi and Lignocellulosic Biomass**: Wiley-Blackwell, 2012. p.1-28. ISBN 9781118414514.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Strong cellulase inhibition by Mannan polysaccharides in cellulose conversion to sugars. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 7, p. 1341-1353, 2014. ISSN 1097-0290.

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. ISSN 0099-2240.

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013. ISSN 1754-6834.

LI, J. et al. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 174, 2013. ISSN 1754-6834.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006. ISSN 0175-7598.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002. ISSN 1092-2172.

MAEDA, R. N. et al. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 38-44, 2013. ISSN 0168-1656.

MARTINEZ, A. T. et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 6, p. 815-831, 2017. ISSN 0734-9750.

MOHANRAM, S. et al. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 1, p. 15, 2013. ISSN 2043-7129.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008. ISSN 1369-5266.

MOHR, A.; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy policy**, v. 63, p. 114-122, 2013. ISSN 0301-4215.

MORANT, M. D. **Polypeptides having beta-glucosidase and beta-xylosidase activity and polynucleotides encoding same**: Google Patents 2014.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005. ISSN 0960-8524.

MUKTHAM, R. et al. A Review on 1st and 2nd Generation Bioethanol Production-Recent Progress. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 6, n. 03, p. 72, 2016.

MÜLLER, G. et al. Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 187, 2015. ISSN 1754-6834.

NAKAZAWA, H. et al. A high performance *Trichoderma reesei* strain that reveals the importance of xylanase III in cellulosic biomass conversion. **Enzyme and microbial technology**, v. 82, p. 89-95, 2016. ISSN 0141-0229.

QUINLAN, R. J. et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079-15084, 2011. ISSN 0027-8424.

ROSE, J. K.; SALADIÉ, M.; CATALÁ, C. The plot thickens: new perspectives of primary cell wall modification. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 296-301, 2004. ISSN 1369-5266.

SAMBROOK, J. R.; RUSSEL, D. DW 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2001.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263-289, 2010. ISSN 1543-5008.

SONG, B. et al. Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monoxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 41, 2018. ISSN 1754-6834.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002. ISSN 0960-8524.

TANGHE, M. et al. Recombinant expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Pichia pastoris*: optimizing yield and N-terminal processing. **Molecular biotechnology**, v. 57, n. 11-12, p. 1010-1017, 2015. ISSN 1073-6085.

TSCHOPP, J. F. et al. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic acids research**, v. 15, n. 9, p. 3859-3876, 1987. ISSN 0305-1048.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000. ISSN 0960-8524.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 219-222, 2010. ISSN 0036-8075.

WANG, S. et al. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33-86, 2017. ISSN 0360-1285.

WANG, W. et al. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 16-27, 2014. ISSN 1369-703X.

WESTERENG, B. et al. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. **Scientific reports**, v. 5, p. 18561, 2015. ISSN 2045-2322.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource technology**, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, 2005. ISSN 0960-8524.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate- based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004. ISSN 1097-0290.

YORK, W. S. et al. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. **Methods in enzymology**, v. 118, p. 3-40, 1986. ISSN 0076-6879.

ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 27, p. 38-45, 2014. ISSN 0958-1669.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004. ISSN 1097-0290.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biocombustíveis de primeira geração são bem implementados em todo o mundo trazendo diversas preocupações futuras com a sua produção. No Brasil, um dos mais importantes produtores de etanol do mundo, a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar está em estreita concorrência com o mercado açucareiro, fazendo com que as matérias-primas fiquem cada vez mais caras, levando a um interesse crescente para os biocombustíveis de segunda geração. O E2G é produzido a partir de biomassa como resíduos florestais, agrícolas que precisam passar por alguns processos e técnicas para que liberem o açúcar que será convertido no biocombustível.

Com este trabalho, fica evidente que a hidrólise enzimática feita na biomassa necessita de uma mistura de enzimas com funções específicas durante a degradação da lignocelulose, que por fim é convertida em açúcares. No entanto há uma necessidade de mais pesquisa em busca de novas enzimas e misturas ideais dessas enzimas, assim como novas técnicas ou aperfeiçoamentos das existentes para reduzir o custo de produção do etanol de segunda geração. A partir do momento em que as técnicas envolvidas na conversão da biomassa forem economicamente aceitáveis, poderá surgir a integração entre biorrefinarias que geram um grande volume de resíduos com a produção de etanol de segunda geração.

Este trabalho trouxe pela primeira vez a utilização da enzima LPMO Cel61a do fungo *T. reesei* heteróloga na hidrólise de uma biomassa vegetal em conjunto com extratos brutos ricos em FPases e β -glicosidases.