



Universidade de Brasília

Laboratório de Enzimologia
Departamento de Biologia Celular

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE LPMOs DE
Trichoderma harzianum TR 274**

Aluno: Natan de Oliveira Bezerra Pereira
Orientador: Eliane Ferreira Noronha
Co-Orientador: Brenda Rabello de Camargo

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Brasília
2025

NATAN DE OLIVEIRA BEZERRA PEREIRA

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE LPMOs DE
***Trichoderma harzianum* TR 274**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Eliane Ferreira Noronha
Co-orientadora: Brenda Rabello de Camargo

Brasília

2025

Natan de Oliveira Bezerra Pereira

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE LPMOs DE
Trichoderma harzianum TR 274**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Eliane Ferreira Noronha

Co-orientadora: Brenda Rabello de Camargo

BANCA EXAMINADORA

Membro interno: Dr. Gabriel Sérgio Costa Alves (UnB)

Membro externo: Dr. Cirano José Ulhoa (UFG)

Suplente: Dr. Alonso Roberto Poma Ticona (UnB)

Brasília

2025

NATAN DE OLIVEIRA BEZERRA PEREIRA

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha. Apoio (CNPq e FAP-DF)

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE LPMOs DE
Trichoderma harzianum TR 274**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:

Prof. Dr. Gabriel Sérgio Costa Alves (UnB)
(Membro interno)

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa - Universidade Federal de Goiás (UFG)
(Membro externo)

Dr. Alonso Roberto Poma Ticona (UnB)
(Suplente)

Prof. Dra. Eliane Ferreira Noronha (UnB)
(Orientadora/Presidente)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha amada família, que com tanta afinco me ajudou a superar cada um dos obstáculos ao longo dos 2 anos de mestrado. Todas as orientações e benfeitorias foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, desde o ensino infantil até agora, sempre me incentivaram e impulsionaram. Naara Oliveira, Sara Oliveira e William Pereira, amo vocês, por vocês eu luto.

Os meus mestrandos! Tantas conversas, choros com experimentos errados e risadas ficarão para sempre em minhas memórias. João Holanda, Vinícius Rocha, Rosália Lorian, amo vocês amigos, espero que saibam o quão importantes foram pra mim nesse período. Desejo o maior sucesso para meus, agora, doutorandos. Contem comigo para o que precisarem.

Às minhas queridas ICs, Júlia Bandeira e Maria Eduarda Chaves que tanto me ajudaram nas infinitas PCRs erradas, ligações de plasmídeo que nunca davam certo, e PCRs quantitativas infernais. Vocês tornaram meus dias melhores, espero que eu tenha conseguido ensinar alguma coisa para retribuir o quanto vocês me ensinaram. Desejo todo êxito do mundo às minhas meninas.

Não posso esquecer do restante dos nossos estudantes, que com tanta eficiência e disponibilidade me ajudaram sempre que precisei. Artur, Derick, Jailson, Maria Clara, Thayane, Yasmin, João Cazé e Sofia. Muito obrigado, amores. Agradeço também aos meus amigos do laboratório vizinho Alencar Peixoto que me socorreu muito fornecendo materiais sempre que eu precisava, e Cezar Júnio pelo incentivo de sempre, me apoiando muitas vezes até tarde no laboratório, pronto para encarar um 110 cheio na volta pra casa.

À minha orientadora Eliane Noronha que me deu essa oportunidade. Sem ainda me conhecer, confiou no meu trabalho. Não tenho nem como te agradecer, prof, muito obrigado por tudo. À minha co-orientadora, Brenda Rabello, por todos os conselhos e ajudas com experimentos, mesmo eu derramando acetona nela. Ao nosso pós-doc Pedro Hamann, que me ajudou demais com as construções dos plasmídeos, verificando sempre quando havia erros e propondo soluções para que fosse possível obter resultados desses experimentos.

Agradeço à Universidade de Brasília, minha segunda casa, por toda estrutura e investimento na minha formação, desde a graduação até agora. Aos órgãos de fomento de pesquisa CNPq e FAP-DF, fundamentais para a construção de uma pós-graduação e ciência fortes no Brasil. Agradeço.

“Ao sem talento, obsessão”

RESUMO

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE LPMOs DE *Trichoderma harzianum* TR 274

Aluno: Natan de Oliveira Bezerra Pereira

Orientadora: Eliane Ferreira Noronha

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

As monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) são enzimas auxiliares dependentes de cobre. Seu mecanismo oxidativo permite a ação dessa enzima na superfície da microfibrila cristalina de celulose, onde as cadeias polissacarídicas estão mais fortemente associadas. O fungo *Trichoderma harzianum* é reconhecido há décadas por sua capacidade em realizar o controle biológico de agentes fitopatogênicos, no entanto, o grande potencial de produção de enzimas ativas sobre carboidrato por esse fungo é de conhecimento mais recente. A caracterização enzimática de proteínas auxiliares oriundas desse fungo é escassa na literatura, assim como a aplicação de tais enzimas em ensaios de sinergismo para hidrólise de substratos insolúveis com a braquiária e o bagaço-de-cana. Análises computacionais revelaram a presença de 6 genes codificadores de LPMOs no genoma do isolado *T. harzianum* TR 274 mantido na coleção de fungos do Laboratório de Enzimologia da UnB, sendo que estas enzimas ainda não foram caracterizadas. O presente trabalho visa a expressão heteróloga das LPMOs dos genes triha 131108 (atividade auxiliar 9) e triha 503137 (atividade auxiliar 11) deste isolado na levedura *Komagataella phaffii* e do gene triha 503137 em *Escherichia coli* para possível aplicação industrial. O gene triha 131108 foi obtido por RT-PCR, clonado em pGEM®-T Easy e subclonado em PPIC9. Devido a dificuldade de clonagem do gene triha 503137, esse foi sintetizado quimicamente por uma empresa especializada. Ambas construções foram utilizadas na transformação da levedura *K.phaffii* por eletroporação. Para expressão da proteína recombinante, a levedura foi cultivada em meio BMGY e inoculada em BMMY com metanol para indução da transcrição. O sobrenadante foi coletado com 24, 48 e 72 e 96 horas de expressão. Para expressão do gene triha 503137 em *E.coli*, o gene de interesse foi subclonado em pET-28a a partir do vetor PPIC9-LPMO503. A expressão da proteína heteróloga ocorreu em meio autoindutor contendo lactose. Foram coletadas as frações solúveis e insolúveis do cultivo celular após ultrassonicação. Tais amostras foram utilizadas para precipitação de proteínas com TCA/acetona e corridas em gel SDS-PAGE. Os resultados do gel SDS-PAGE da proteína triha 131108 apontaram para a possível expressão da proteína heteróloga em tamanho correto. A proteína LPMO 503 foi expressa com sucesso em *E.coli*, tendo sido confirmada por western blot. Para determinação do perfil de expressão gênica dos 6 genes de LPMOs de *T.harzianum* contidos em banco de dados, foi realizado o experimento de qPCR com o fluoróforo SYBR Green. Os resultados preliminares indicam uma maior qualidade na obtenção de dados de expressão relativa ao se utilizar o conjunto de primers dos genes de Actina e a-tubulina como genes de referência em comparação a utilização de actina e fator de alongação alfa. Foi possível também verificar o aumento da expressão dos genes *triha488374* e *triha99387* no cultivo do fungo em bagaço-de-cana e braquiária.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Composição de materiais lignocelulósicos e seus potenciais produtos de hidrólise e compostos de degradação posteriores. 16
- Figura 2. Mecanismo de oxidação de LPMOs por meio dos carbonos C1 e C4. Ao oxidar o carbono 1 (C1), as LPMOs são capazes de produzir uma extremidade redutora de lactona. Por outro lado, ao oxidar o carbono 4 (C4), é produzida uma extremidade não redutora de cetoaldose. 22
- Figura 3. Mecanismo canônico de secreção de proteínas em eucariotos. A secreção da proteína nascente contendo o fator de secreção (em vermelho) ocorre por meio da ligação dessa sequência ao complexo SRP. Esse complexo liga-se ao seu receptor SR (em amarelo), e tem o fator de secreção clivado no retículo endoplasmático. Em seguida a proteína segue ao complexo golgiense por vesículas transportadoras, seguindo o caminho para secreção até a membrana plasmática mediada pelo complexo SNARE. 24
- Figura 4. A. Árvore filogenética das LPMOs AA10 construída por meio da técnica ‘ancestral sequence reconstruction’. Anc1: Ancestral comum de todas as LPMOs AA10. Anc2: Último ancestral comum das LPMOs AA10 quitinolíticas. Anc3: Último ancestral comum das LPMOs AA10 das gamaprotobactérias e bacilos. Anc4: Ancestral mais recente da mesma diversificação taxonômica. B. Estrutura tridimensional das LPMOs preditas para construção da árvore filogenética. 26
- Figura.5. Modelo tridimensional da LPMO 993. Em A está representada a estrutura tridimensional da enzima com o cobre posicionado em seu sítio ativo. Em B está indicado com detalhes o ‘histidine brace’ e a tirosina que realizam a coordenação do átomo de cobre no sítio ativo. 38
- Figura.6. Esquema de predição de estruturas secundárias da LPMO 993. As setas amarelas indicam folhas-beta pregueadas, os cilindros vermelhos representam estruturas de alfa-hélice, e os traços lilás apresentam a formação de pontes dissulfeto. As áreas tracejadas indicam a localização do ‘histidine brace’ e do módulo de ligação a carboidrato 1 (CBM1). 39
- Figura.7. Modelo tridimensional da LPMO 503. Em A está representada a estrutura tridimensional da enzima com o cobre posicionado em seu sítio ativo. Em B está indicado

com detalhes o ‘histidine brace’ e a tirosina que realizam a coordenação do átomo de cobre no sítio ativo. 40

Figura.8. Esquema de predição de estruturas secundárias da LPMO 503. As setas magenta indicam folhas-beta pregueadas, os cilindros vermelhos representam estruturas de alfa-hélice, as linhas tracejadas mostram pontes dissulfeto, e as estrelas verdes apontam os resíduos constituintes do ‘histidine brace’, 41

Figura.9. Árvore filogenética que agrupa as LPMOs de atividade auxiliar 9 de regiosseletividade C1,C4. Em vermelho são representadas as LPMOs 993 e 448 de *Trichoderma Harzianum*. 42

Figura.10. Árvore filogenética que agrupa as LPMOs de atividade auxiliar 9 de regiosseletividade C4. Em vermelho está representada a LPMO 131 de *Trichoderma Harzianum*. 44

Figura.11. Alinhamento LPMOs 993 e 488 com enzimas caracterizadas. As caixas vermelhas 1,2 e 4 indicam os resíduos do ‘histidine brace’. A caixa vermelha 3 mostra o sítio de ligação ao oxigênio molecular. A caixa com asterisco evidencia o resíduo de asparagina conservado que pode determinar a regiosseletividade da enzima. A seta azul indica o resíduo de prolina conservado em LPMOs de regiosseletividade C1/C4. 46

Figura.12. Alinhamento LPMO 131 com enzimas caracterizadas. As caixas vermelhas 1,2 e 4 indicam os resíduos do ‘histidine brace’. A caixa vermelha 3 mostra o sítio de ligação ao oxigênio molecular. 47

Figura.13. Alinhamento LPMOs 503,630 e 774 com enzimas caracterizadas. As caixas vermelhas 1,2 e 3 indicam os resíduos do ‘histidine brace’. As setas azuis indicam regiões de formação de pontes dissulfeto. As seta verde com asterisco indicam a alanina conservada em LPMOs C1 ou C4 restritas. 48

Figura.14 Gel de eletroforese da extração de RNA total com Trizol. Os poços de 1 a 3 contém o material genético extraído de micélios do fungo crescido em glicose por 2 dias. Os poços de 3 a 6 possuem o material genético extraído de micélios do fungo crescido em glicose por 4 dias. Os poços 7 a 10 possuem o material genético extraído de micélios do fungo crescido em glicose por 6 dias. 49

Figura.15 Gel de eletroforese da PCR do gene 503. As linhas 1,2 e 3 são triplicatas da amplificação do gene *trih503197*, e possuem tamanho de 615bp. A linha MM indica o marcador molecular. 50

Figura.16. Gel de eletroforese da PCR do gene *trih131*. As linhas 1 e 2 apresentam uma duplicata do produto de PCR do gene de interesse, o qual apresenta o tamanho de 1073pb. A linha MM apresenta o marcador molecular. 50

Figura.17. Gel de eletroforese da digestão do vetor pGEM-503 com as enzimas NotI/EcoRI. A linha 1 apresenta o vetor pGEM-503 digerido com as enzimas NotI/EcoRI, ocorrendo a liberação do inserto de 615pb indicada pela seta vermelha, a seta verde indica o plasmídeo vazio com 3000pb. A linha 2 apresenta o controle negativo, com o plasmídeo pGEM®-T Easy que não contém o inserto. 51

Figura.18. Gel de eletroforese do vetor pGEM-131 digerido com as enzimas NotI/EcoRI. É possível visualizar a liberação do inserto de 1073bp. O vetor vazio aparece no tamanho de 3000bp. 52

Figura.19. Gel de eletroforese da eluição das bandas do inserto obtido na digestão do vetor pGEM-131. As bandas de tamanho 8024bp representam o plasmídeo PPIC9 digerido e eluído, ao passo que as bandas de 1073bp indicam o inserto que foi eluído. 52

Figura.20. Gel de eletroforese da linearização do plasmídeo PPIC9-131 com a enzima SacI. A banda obtida corresponde ao tamanho de 9052bp, a qual corresponde ao tamanho do plasmídeo PPIC9 mais o gene *trih131108*. 53

Figura.21. Gel de eletroforese da PCR de colônia de GS115-PPIC9-LPMO131. O poço 1 apresenta o produto de amplificação de um clone positivo no tamanho de 1522bp, correspondendo ao tamanho do gene mais o fragmento de interesse. 54

Figura.22. Gel de eletroforese da PCR de 5 colônias de XL-10-GOLD transformadas com o plasmídeo PPIC9-503. Os poços do gel de eletroforese apresentam diferentes clones crescidos em meio LB sólido com ampicilina. Tais clones foram testados para dois diferentes pares de primers, primers que amplificam a região AOX (A), e primers que amplificam o gene de interesse completo (B). Todos os clones testados apresentaram amplificação de um fragmento de 615bp correspondente ao gene completo *trih503197*. Por outro lado, somente o clone 1 apresentou fragmentação do fragmento AOX de tamanho 1139bp. MM indica o marcador molecular. 55

Figura.23. Gel de eletroforese da digestão do plasmídeo PPIC9-503 com a enzima SacI. As linhas 1,2 e 3 apresentam o material plasmidial digerido de tamanho 8998bp. MM indica o marcador molecular. 56

Figura.24. Gel de eletroforese da PCR de 4 colônias de GS115 transformadas com o plasmídeo PPIC9-503. As linhas 1,2,3 e 4 apresentam a amplificação do fragmento AOX de

diferentes clones. Somente os clones das linhas 2 e 3 apresentaram amplificação clara no tamanho de 1139bp. 56

Figura.25 Gel SDS-PAGE corado com comassie-blue (A) e nitrato de prata (B) do sobrenadante do clone K.phaffi-PPIC9-LPMO131 induzido por 96 horas em meio mínimo (MM) e meio tamponado contendo extrato de levedura e metanol (BMMY). As setas indicam a proteína de interesse no tamanho de 38,8 kDa. As linhas 1,2 e 3 indicam o sobrenadante da levedura crescida em meio BMMY por 96, 72 e 48 horas, respectivamente. As linhas 4,5,6 e 7 indicam o sobrenadante do cultivo em MM crescido por 96,72,48 e 24 horas, respectivamente. 58

Figura.26. Gel SDS-PAGE do sobrenadante do clone GS115-PPIC9-LPMO131 e controles negativos. A linha 1 apresenta um clone negativo, o qual não apresenta a amplificação da região AOX por PCR de colônia. As linhas 2 e 3 apresentam o sobrenadante do clone positivo, evidenciando a proteína heteróloga de tamanho 38,8 KDa. As linhas 4 e 5 apresentam o sobrenadante da levedura transformada com o vetor PPIC9 vazio. 58

Figura.27. Espectro de massa da proteína LPMO 131. Foram identificados picos em 760.43, 814.487, 890.387, 915.450, 987.506, 1063.447, 1255.470, 1504.625, 1603.739, 1822.682, 2240.951, 2540.199, 3137.372, 3391.417. 59

Figura.28. Resultado da busca da proteína pelo espectro de massas obtido no software MASCOT. A proteína indicada pelo software foi o fator de necrose tumoral C1q de *Bos taurus*. 60

Figura.29. Gel SDS-PAGE do sobrenadante do clone GS115-PPIC9-LPMO503 e controles negativos. A linha 1 apresenta um clone negativo, o qual não apresenta a amplificação da região AOX por PCR de colônia. A linha 2 apresenta o sobrenadante do clone positivo, é possível verificar uma banda de expressão de altura aproximada de 23,64 Kda. A linha 3 indica o sobrenadante da levedura transformada com o vetor PPIC9 sem o gene de interesse. 61

Figura.30. Gel de eletroforese da digestão dupla do vetor pET28a-LPMO503 pelas enzimas NotI/EcoRI. A linha 1 apresenta a digestão do plasmídio contendo o gene de interesse, sendo possível observar a liberação do inserto de 615bp. A linha 2 apresenta o mesmo plasmídio digerido unicamente com a enzima NotI para comparação de tamanho. A linha MM apresenta o marcador molecular. 62

Figura.31. Gel SDS-PAGE da fração solúvel de 5 clones BL21(DE3)-pET28a-LPMO503. As linhas 1 a 5 apresentam os sobrenadantes dos diferentes clones induzidos em meio

autoindutor. A linha MM apresenta o marcador de peso molecular. É possível verificar uma banda de expressão de altura aproximada de 23,64 Kda em todas as amostras. 63

Figura.32. Gel SDS-PAGE das frações purificadas por cromatografia de afinidade. As linhas 1 até 4 apresentam as frações que não se ligaram à coluna de níquel. As linhas 5 até a 16 apresentam as frações eluídas da coluna com o aumento do gradiente de imidazol (frações 25,27,29,31,33,35,37,39,41,43,47 no cromatograma). 64

Figura.33. Western blot da fração solúvel de 5 clones BL21(DE3)-pET28a-LPMO503. As linhas A e D apresentaram banda visível para imunodeteção com anticorpo anti His-Tag de tamanho aproximado a 25 KDa. 65

Figura.34. Fórmula para o cálculo de M pelo software Genorm. M_i é o valor da estabilidade do gene, n é o número de condições experimentais, ΔCT_{ij} e ΔCT_{kj} são as diferenças nas expressões relativas entre os genes de referência i e k na amostra j . 66

Figura.35. Fórmula para o cálculo de CV pelo software Genorm. σ é o desvio padrão das expressões relativas do gene de referência. μ é a média das expressões relativas do gene de referência. 66

Figura.36 Resultados de M e CV para dois conjuntos de genes de referência distintos. Ao considerar os valores obtidos do gene EF, os parâmetros de qualidade distanciam-se do valor ideal. 67

Figura.37. Expressão relativa do gene LPMO *trih448374* crescido em meio mínimo com braquiária (1%) por 8 dias utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O eixo y representa numericamente o aumento de expressão com relação ao controle crescido em glicose. 68

Figura.38 Expressão relativa do gene LPMO *trih448374* crescido em meio mínimo com bagaço-de-cana (1%) por 8 dias utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O eixo y representa numericamente o aumento de expressão com relação ao controle crescido em glicose. 68

Figura.39. Expressão relativa do gene LPMO *trih99387* crescido em meio mínimo com braquiária (1%) por 8 dias utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O eixo y representa numericamente o aumento de expressão com relação ao controle crescido em glicose. 69

Figura.40. Expressão relativa do gene LPMO *trih99387* crescido em meio mínimo com bagaço-de-cana (1%) por 8 dias utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O eixo y representa numericamente o aumento de expressão com relação ao controle crescido em glicose. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela com número de enzimas de atividade auxiliar por família até então caracterizadas no banco de dados CAZy	20
Tabela 2. Sequência e temperatura de anelamento dos primers utilizados para amplificação dos genes de LPMO de <i>Trichoderma harzianum</i> .	30
Tabela 3. Sequência e Tm dos primers utilizados para amplificação dos genes de LPMO de <i>Trichoderma harzianum</i> por qPCR.	37
Tabela 4. Conteúdo GC para cada um dos genes de LPMO em estudo.	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A matéria vegetal como fonte energética	15
1.2 Os desafios na desconstrução da biomassa vegetal	16
1.2 O gênero Trichoderma como fonte de enzimas ativas sobre carboidrato	17
1.3 Enzimas ativas sobre carboidrato	17
1.3.1 Glicosil-hidrolases	17
1.3.2 Glicosil-transferases	18
1.3.3 Liases de polissacarídeos	18
1.3.4 Esterases de polissacarídeos	19
1.4 Enzimas de atividade auxiliar	19
1.5 Características gerais de LPMOs	20
1.6 Regiosseletividade e especificidade ao substrato de LPMOs	21
1.7 Expressão Heteróloga de enzimas de interesse biotecnológico	22
1.8 Evolução das LPMOs	24
1.9 O efeito sinérgico das LPMOs	26
1.10 Expressão de enzimas ativas sobre carboidrato em fungos	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos gerais	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Análises computacionais de LPMOs	29
3.2 Crescimento do fungo	29
3.3 Extração de mRNA	29
3.4 Transcrição reversa	30
3.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	30
3.6 Clonagem no vetor pGEM®-T Easy	31
3.7 Subclonagem no vetor pPic9	31
3.8 PCR de colônia em células da linhagem XL-10-GOLD	32
3.9 Síntese de plasmídeos	32
3.10 Transformação em Komagataella phaffii	32
3.11 Expressão protéica em K. phaffii	33
3.12 Análise do perfil de expressão de clones de K. phaffii por SDS-PAGE	33

3.13	Tripsinização e Espectrometria MALDI-TOF para identificação proteica	33
3.14	Clonagem do gene triha503197 em pET-28a(+)	34
3.15	Expressão do gene triha503197 em BL21(DE3)	35
3.16	Purificação da proteína LPMO503 por His-Tag	35
3.17	Western Blot da proteína LPMO503	36
3.13	Análise da expressão de LPMOs por qPCR	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Modelos tridimensionais das LPMOs 503 e 993	38
4.1.1	Modelagem da LPMO 993	38
4.1.2	Modelagem da LPMO 503	39
4.2	Construção da árvore filogenética de LPMOs de atividade auxiliar 9 (AA9)	41
4.3	Alinhamento das sequências de LPMOs AA9	45
4.4	Alinhamento das sequências de LPMOs AA11	48
4.5	Clonagem dos genes triha 131108 e triha 503197 por metodologia tradicional	49
4.6	Clonagem do gene triha 503197 sintetizado quimicamente	54
4.7	Expressão da proteína LPMO 131	57
4.8	Identificação da LPMO 131 por espectrometria de massas (MALDI/TOF)	59
4.9	Expressão da proteína LPMO 503 em GS115	60
4.10	Clonagem do gene triha503197 em BL21(DE3)	61
4.11	Expressão do gene triha503197 em BL21(DE3)	63
4.12	Western blot LPMO 503	65
4.13	Análise da expressão dos genes de LPMO de Trichoderma Harzianum por qPCR	66
4.13.1	Análise dos genes de referência actina (act), a-tubulina (a-tub), e fator de alongação	66
4.13.2	Análise da expressão relativa de LPMOs	67
5	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

O mercado global de enzimas tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos, atingindo o valor de ~10 Bilhões de dólares em 2019, com previsão de crescimento entre 5 e 7% ao ano¹. Essas biomoléculas possuem aplicações diversas, que vão desde o uso na saúde humana e animal, até utilização na produção de biocombustíveis. As enzimas ativas sobre carboidrato têm sido especialmente estudadas para aplicação industrial devido sua capacidade de degradação da biomassa vegetal. Esse material é muito gerado como resíduo industrial, e seu aproveitamento para geração de novos produtos é um desafio importante para o fortalecimento da economia circular. A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por uma rede altamente complexa do homopolissacarídeo celulose (40–60% do peso seco), vários heteropolissacarídeos hemicelulósicos (20–35% do peso seco) e o polímero aromático lignina (15–40% do peso seco)². De maneira geral, as enzimas ativas sobre carboidrato atuam realizando a clivagem das ligações glicosídicas presentes nesses polissacarídeos para produção de açúcares mais simples estruturalmente, os quais podem ser mais facilmente utilizados em processos fermentativos. Os fungos filamentosos produzem uma grande variedade de enzimas ativas sobre carboidrato, entre eles o fungo *Trichoderma Harzianum*.

1.1 A matéria vegetal como fonte energética

Desde os primórdios da humanidade, a matéria lignocelulósica tem sido utilizada como fonte geradora de energia para utilidades tais como aquecimento, cocção de alimentos e obtenção de luz³. A queima desse material pode gerar ~15 MJ.kg⁻¹, um terço da energia gerada pela queima dos combustíveis fósseis⁴. Com o avanço da tecnologia de fermentação e de bioprocessos, a matéria vegetal passou a ser utilizada para geração de biocombustíveis como alternativa sustentável e ecológica para produção de energia. Em uma análise mais detalhada, cada componente da parede vegetal pode gerar diferentes produtos para utilização metabólica dos agentes fermentadores. A hemicelulose (11-37% do peso da parede vegetal) é capaz de produzir ácido acético, pentoses e hexoses, os quais podem ser metabolizados em ácido fórmico e ácido levulínico. A celulose (32-54%), por sua vez, ao ser metabolizada, pode gerar monômeros de glicose. A lignina (17-32%) ao ser hidrolisada, pode produzir compostos fenólicos de interesse econômico (Figura 1.)

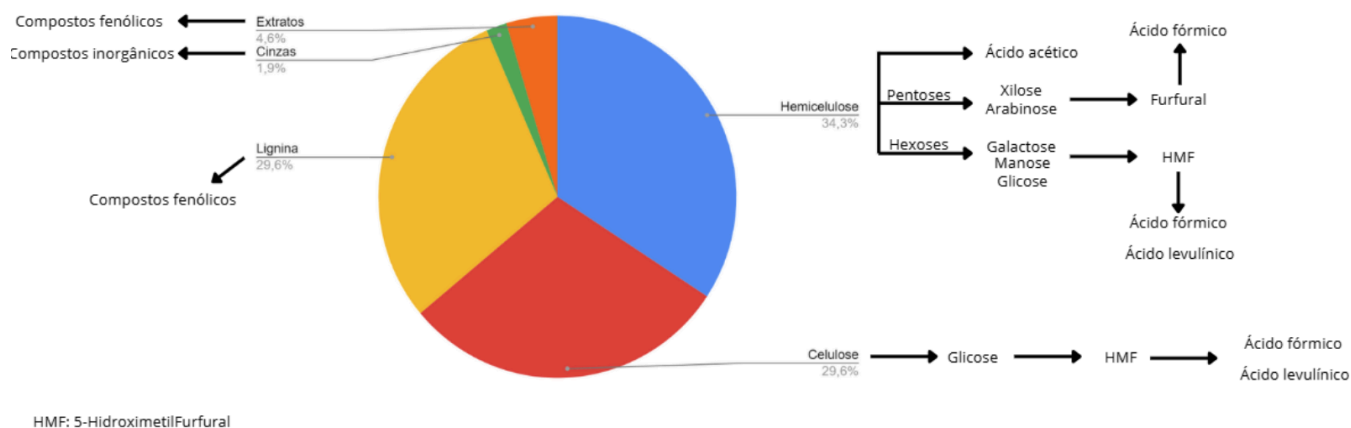


Figura 1. Composição de materiais lignocelulósicos e seus potenciais produtos de hidrólise e compostos de degradação posteriores.

1.2 Os desafios na desconstrução da biomassa vegetal

Em um mundo globalizado, a utilização de combustíveis fósseis ainda é de grande importância para o funcionamento das indústrias, meios de transporte e produção de energia em geral. O carvão, petróleo e gás natural representam 82% da matriz energética global⁵. Em geração de eletricidade, em 2024, os combustíveis fósseis foram a matéria prima utilizada para produzir 59% da energia elétrica mundial⁶. Apesar da eficiência desses materiais para produção de energia, sua utilização massiva pode gerar efeitos drásticos ao meio ambiente. Desde 1750, foram acumulados 2.596 Gt de CO₂ de origem humana (combustíveis e uso da terra), dos quais aproximadamente 42 % permanecem na atmosfera atualmente. Estimativas apontam que as emissões associadas à queima de combustíveis fósseis podem causar até 11,5 milhões de mortes por calor excessivo até 2100, caso não ocorra rápida mitigação^{7,8}. Uma opção sustentável aos combustíveis fósseis é a utilização da biomassa vegetal para produção de energia, principalmente em se tratando da produção de combustíveis de segunda geração (2G). O Brasil gera atualmente cerca de 330 milhões de toneladas por ano de resíduos agrícolas e agroindustriais, incluindo resíduos de culturas, agroindustriais e florestais, os quais poderiam servir como matéria-prima para biocombustíveis de segunda geração⁹. Tais resíduos não podem ser diretamente utilizados para processos de fermentação alcoólica, uma vez que as leveduras fermentadoras não conseguem obter açúcares simples em cadeias longas de celulose e hemicelulose, principalmente quando estão ligadas à lignina¹⁰. Dessa maneira, para que seja possível a obtenção de biocombustíveis de segunda geração, é de grande importância

o pré-tratamento da matéria orgânica por métodos físico ou químicos¹¹, assim como a utilização de coquetéis enzimáticos capazes de quebrar as longas cadeias polissacarídicas disponíveis na biomassa vegetal ¹². Devido à complexidade desses processos, a produção de biocombustíveis de segunda geração ainda não é economicamente viável, tendo seu custo de produção entre US\$0,7-1/litro, enquanto os biocombustíveis de primeira geração apresentam custo entre US\$0,3-0,45/litro¹³.

1.2 O gênero *Trichoderma* como fonte de enzimas ativas sobre carboidrato

A maior parte dos produtos compostos por enzimas no mercado possuem origem fúngica¹⁴. Os fungos do gênero *Trichoderma* podem ter suas enzimas utilizadas na composição de aditivos alimentares. Esse gênero é conhecido por ser encontrado em uma grande quantidade de ecossistemas e pode ser facilmente cultivado *in vitro*. Há mais de 6 décadas são utilizados para biocontrole de agentes patogênicos em plantas. Para além de sua utilização para fins de controle biológico, o gênero *Trichoderma* possui potencial para degradação de substratos lignocelulolíticos. A análise do genoma das 12 espécies mais comuns do gênero *Trichoderma* revelou que esses fungos possuem entre 269 e 361 genes codificadores de CAZymes, dos quais as Glicosil Hidrolases (GHs) representaram mais de 50% das CAZymes, sendo as quitinases GH18, β -1,3/1,4-glucanases GH16 e β -glicosidases GH3 presentes em maior número¹⁵.

A espécie *Trichoderma harzianum* também se destaca na produção de enzimas com potencial biotecnológico. A análise do genoma da espécie revelou 259 genes de GHs, 101 de Glicosil Transferases (GTs), 46 da família Módulo de ligação a Carboidrato (CBMs) e 42 de Atividade Auxiliar (AA)¹⁶. Entre as enzimas de atividade auxiliar, estão classificadas as Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs).

1.2 Enzimas ativas sobre carboidrato

As enzimas ativas sobre carboidrato são divididas nas classes glicosil hidrolases, glicosil transferases, liases e esterases.

1.2.1 Glicosil-hidrolases

As glicosil hidrolases constituem o grupo mais diverso das enzimas ativas sobre carboidrato. Seu mecanismo de ação consiste na hidrólise da ligação glicosídica catalisada por dois resíduos de aminoácidos da enzima, um ácido geral (doador de prótons) e um nucleófilo¹⁷. Esse grupo de enzimas tem sido utilizado para aplicação industrial há décadas. Somente entre as alfa-amilases, até 2020, foram depositadas 186 patentes: 84 (biocombustíveis), 41 (bebidas), 16 (fármacos), 15 (detergentes), 11 (alimentos), 10 (ração animal) e 9 (têxteis)¹⁸, o que demonstra a versatilidade desse grupo em número de aplicações industriais.

1.2.2 Glicosil-transferases

As glicosil-transferases (GTs) são enzimas que catalisam a transferência de resíduos de monossacarídeos ativados (como UDP-glicose) para aceptores (como proteínas, lipídios ou outros açúcares), formando ligações glicosídicas¹⁹. As glicosil-transferases atuam de duas formas diferentes, inversão ou retenção da configuração anomérica do carbono do açúcar doador. As glicosiltransferases inversoras provavelmente seguem um mecanismo de deslocamento único, em que o aceptor realiza um ataque nucleofílico no carbono 1 do açúcar doador²⁰. Por outro lado, as glicosiltransferases retentoras não possuem seu mecanismo de ação totalmente elucidado. A hipótese mais aceita é o do mecanismo de duplo deslocamento, no qual um resíduo nucleofílico da enzima ataca o carbono anomérico do açúcar doador, formando um intermediário covalente. Em seguida, o aceitador ataca esse intermediário, liberando a enzima e formando o produto final com a mesma configuração anomérica¹⁸.

1.2.3 Liases de polissacarídeos

As liases de polissacarídeos são enzimas que clivam ligações glicosídicas de certos polissacarídeos sem a adição de água e sem a participação de oxidantes. Em vez disso, elas realizam a quebra por um mecanismo β -eliminativo, resultando na formação de duplas ligações nos produtos finais, geralmente em urônicos ou desoxiaçúcares²¹. Esse grupo de enzimas é altamente diverso, apresentando 44 famílias. Isso sugere que as liases surgiram mais de uma vez durante a evolução a partir de estruturas totalmente diferentes. A aplicação industrial dessas enzimas é de grande interesse econômico, principalmente em se tratando da degradação do alginato, um tipo de polissacarídeo ácido linear que consiste em α -L-guluronato e β -D-manuronato. Tanto o alginato quanto seus produtos de degradação

(oligossacarídeos de alginato) possuem abundantes atividades biológicas, como atividade antioxidante, atividade antitumoral e atividade antimicrobiana ²².

1.2.4 Esterases de polissacarídeos

As esterases de carboidratos catalisam a de-O ou de-N-acilação de sacarídeos substituídos. Elas atuam na remoção de grupos acetil, feruloil ou p-cumaroil ligados a polissacarídeos vegetais, facilitando a degradação dessas moléculas por outras enzimas, como celulases e xilanases. Aplicações biotecnológicas são viáveis para esse grupo de enzimas, uma vez que facilitam a produção de ésteres de alto valor agregado, como estolídeos fenólicos com função antimicrobiana, ou o ferulato de etila com função antioxidante para cosméticos ²³.

1.3 Enzimas de atividade auxiliar

De acordo com o banco de dados CAZy, as enzimas auxiliares (AAs) são enzimas com atividade redox que atuam em conjunto com outras enzimas ativas sobre carboidrato. Essa classe apresenta 9 famílias de enzimas lignolíticas e 7 de LPMOs. As enzimas AA1 caracterizadas são multicobre oxidases que utilizam difenóis e substâncias relacionadas como doadores, tendo oxigênio como acceptor. Para além das LPMOs, a família AA1 é atualmente dividida em 3 subfamílias, incluindo lacases, ferroxidases e multicobre oxidases semelhantes a lacases. A família AA2 contém peroxidases modificadoras de lignina de classe II. As enzimas AA2 são enzimas secretadas contendo um grupamento heme que utilizam peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos como aceptores de elétrons para catalisar uma série de reações oxidativas nas quais dois elétrons são derivados de moléculas do substrato para reduzir a enzima, seguida pela liberação concomitante de duas moléculas de água. As enzimas AA3 pertencem à família das oxidoredutases de glicose-metanol-colina (GMC). As enzimas AA3 são flavoproteínas que contêm um domínio de ligação ao dinucleotídeo flavina-adenina (FAD). A família AA4 contém vanilil-álcool oxidases (VAO) que catalisam a conversão de uma ampla gama de compostos fenólicos com cadeias laterais na posição para do anel aromático. A família AA5 é formada por oxidases de radicais de cobre e inclui duas subfamílias. Todas as proteínas AA6 caracterizadas experimentalmente são 1,4-benzoquinona redutases. Estas são enzimas intracelulares envolvidas na biodegradação de compostos aromáticos e na proteção de células fúngicas contra compostos quinônicos reativos. As AA7 são glicooligossacarídeos oxidases que oxidam os resíduos glicosil redutores dos

oligosacarídeos ligados por ligações alfa ou beta-1,4. As proteínas da família AA8 consistem em um domínio citocromo de classe espectral b. As proteínas AA8 foram inicialmente descritas como o módulo hêmico N-terminal encontrado na organização do domínio bipartido do flavocitocromo CDH. Elas podem ser encontradas isoladas ou anexadas a um CBM. Por fim, as AA12 são as enzimas menos conhecidas entre as enzimas de atividade auxiliar, possuindo apenas 1 caracterização até o momento. A tabela 1 apresenta uma relação entre enzimas de atividade auxiliar que são consideradas LPMOs, sua origem e o substrato sobre o qual possuem atividade.

Família (AA)	Origem	Substrato
9	Fúngica	Celulose
10	Bacteriana	Celulose/Quitina
11	Fúngica	Quitina
13	Fúngica	Amido
14	Fúngica	Xilana
15	Insetos, vírus	Celulose/quitina
16	Fúngica	Celulose

Tabela 1. Tabela de famílias de LPMO, sua origem e substrato sobre o qual as enzimas são ativas.

1.4 Características gerais de LPMOs

As LPMOs compreendem 7 famílias de enzimas, AA9, AA10, AA11, AA13, AA14, AA15, AA16. As atividades auxiliares 9 e 10 são as mais estudadas, e representam as Glicosil Hidrolases da família 61 (GH61) e enzimas auxiliares com Módulo de Ligação a Carboidrato 33 (CBM33), respectivamente.

As LPMOs são classificadas como enzimas de atividade auxiliar dependentes de cobre. Essas enzimas foram descobertas em 1998²⁴, porém somente a partir de 2010 foram identificadas como sendo diferentes da família glicosil-hidrolase²⁵. Ao contrário das celulases tradicionais que requerem a presença de uma cadeia de substrato isolada e solta na fenda ou túnel do sítio ativo para realizar a clivagem, o forte mecanismo oxidativo do LPMO pode permitir a oxidação na superfície de uma microfibrila cristalina de celulose, onde as cadeias são empacotadas²⁶. O seu mecanismo de ação consiste em um ataque do cobre reduzido do sítio ativo a ligações glicosídicas- β -1,4 nas atividades auxiliares 9,10 e 11 e ataque a ligações glicosídicas- α -1,4 na atividade auxiliar 13. O cobre é fixado ao sítio ativo da enzima por meio de uma região conhecida por '*Histidine Brace*'. Essa região consiste em dois resíduos de

histidina que expõem o cobre ao ambiente da reação enzimática. Os dois átomos de nitrogênio das cadeias laterais da histidina e um terceiro nitrogênio do N-terminal interagem com o átomo de Cu a uma distância próxima de 2 Å²⁷. A reação oxidativa começa com a redução do cobre por um redutor externo seguido pelo mecanismo ainda debatido envolvendo a reação com O₂ ou H₂O₂²⁸ para gerar espécies de oxigênio altamente reativas que podem adicionar uma hidroxila no carbono C1 e/ou C4 da ligação glicosídica, e só então clivá-la. As LPMOs geralmente dependem de uma espécie redutora externa, a qual pode ser o ácido ascórbico, ou outras moléculas menos conhecidas para essa função, tais como fenóis derivados da lignina²⁹.

Em termos estruturais, as LPMOs apresentam alguma identidade no centro catalítico da enzima. O núcleo do domínio catalítico é um sanduíche β de sete a nove folhas β. As alças que conectam essas fitas β constituem a superfície de ligação ao substrato, que acredita-se que interaja com as superfícies de substratos cristalinos. A região localizada entre β1 e β2 das LPMOs AA9 (entre β1 e β3 nas LPMOs AA10) é denominada L2, e inclui um número variável de alças e hélices curtas. Algumas LPMOs possuem uma inserção entre β3 e β4, denominada L3, que interage com L2. Nas LPMOs AA9 e AA13, há alça curta no lado oposto de L2. Além disso, os membros da AA9 possuem uma alça C-terminal longa, denominada LC. Conforme discutido abaixo, o comprimento variável e a constituição de aminoácidos dessas alças podem contribuir para a especificidade e regiosseletividade do substrato. A histidina N-terminal de alguns LPMOs fúngicos é metilada no Nε2, e o significado dessa metilação não é claro.^{30,31}

1.5 Regiosseletividade e especificidade ao substrato de LPMOs

As diferentes famílias conhecidas de LPMOs possuem diferentes substratos sobre os quais exercem atividade. As atividades auxiliares 9,11,13,14 são majoritariamente de origem fúngica, e possuem atividade sobre celulose, quitina, amido e xilana, respectivamente. As AA10s são principalmente bacterianas e possuem atividade sobre celulose ou quitina. As AA15s são de eucariotos (incluindo insetos) ou vírus, com atividade em celulose ou quitina³². A clivagem atualmente relatada de substratos de quitina, amido e xilana é oxidada em C1, enquanto a clivagem de substratos celulósicos é oxidada em C1 ou C4, ou ambos. As LPMOs AA10 apresentam motivos conservados em L2 que variam de acordo com o substrato sobre o qual a enzima é ativa. Em enzimas ativas sobre celulose, o motivo consiste de aminoácidos não polares, (Y[W]NWF[N]G[A]V[N]L[Y]). Por outro lado, as LPMOs ativas sobre quitina apresentam aminoácidos polares nessa região, (Y[W]EPQSVE)³³. A determinação de

regiosseletividade pode ser desafiadora, uma vez que as massas dos produtos oxidados por C1 e C4 são idênticas, mas ainda pode ser possível derivar informações sobre a regiosseletividade oxidativa. A oxidação em C4 produz um 4-ceto-açúcar que está em equilíbrio com uma forma gemdiol. Por outro lado, a lactona produzida pela oxidação de C1 está em equilíbrio com uma forma de ácido aldônico (ou seja, um grupo carboxílico), que domina em pH neutro³⁴ (Figura.2).

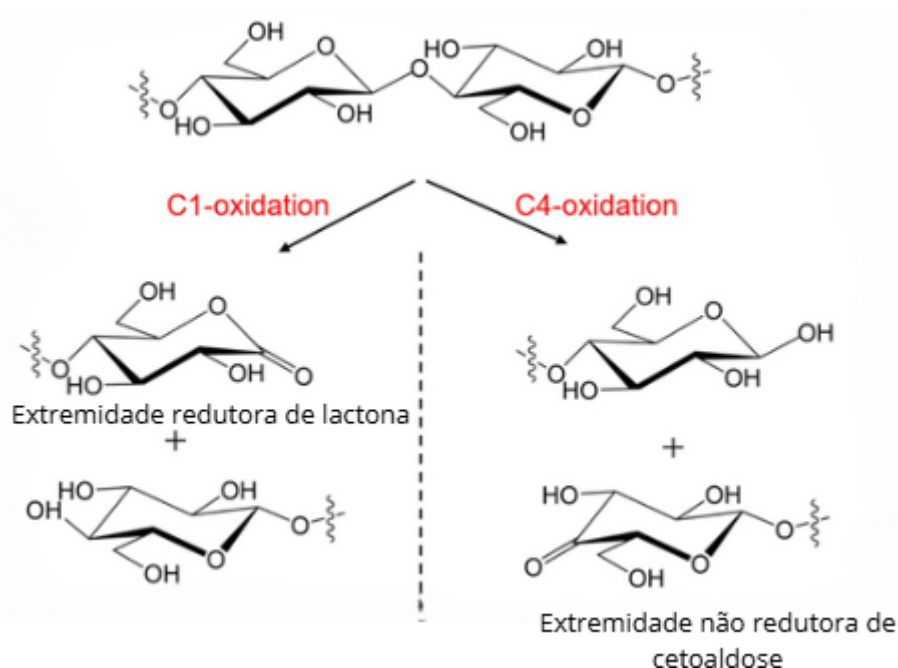


Figura 2. Mecanismo de oxidação de LPMOs por meio dos carbonos C1 e C4. Ao oxidar o carbono 1 (C1), as LPMOs são capazes de produzir uma extremidade redutora de lactona. Por outro lado, ao oxidar o carbono 4 (C4), é produzida uma extremidade não redutora de cetoaldose. Figura adaptada de Zhu et al, 2020.

1.6 Expressão Heteróloga de enzimas de interesse biotecnológico

Os principais organismos utilizados para expressão heteróloga de LPMOs são a bactéria *E. coli* para enzimas de procaríotos e a levedura *K.phaffii* para enzimas de eucariotos. O resíduo de aminoácido de histidina localizada no N-terminal dessas proteínas é crítico para manutenção da atividade catalítica das LPMOs, o que limita as opções de expressão. A levedura *Komagataella phaffii* é amplamente utilizada para expressão de proteínas que necessitam de modificações pós-traducionais para desempenhar sua atividade biológica,

sendo capaz de realizar glicosilações ligadas ao nitrogênio, glicosilações ligadas ao oxigênio, fosforilações e acetilações ³⁵. Apesar da realização dessas modificações, os padrões de glicosilação são diferentes daqueles encontrados na proteína naturalmente. Como exemplo disso, as LPMOs fúngicas apresentam glicosilação no resíduo His1, a qual não ocorre quando essas enzimas são produzidas em *K.phaffii*, conforme demonstrado pelas estruturas cristalinas das LPMOs produzidas nessa levedura ³⁶. Os principais vetores utilizados para expressão nessa levedura são os vetores comerciais pPIC. Entre os mais utilizados estão o PPIC9 e o pPICZ α . O vetor PPIC9 utiliza-se de seleção auxotrófica por meio do gene HIS4, o qual codifica uma proteína multifuncional envolvida na biossíntese da histidina em leveduras. A linhagem GS115 possui esse gene deletado, impedindo o crescimento dessa levedura em meios com ausência de histidina. Por outro lado, o vetor pPICZ α utiliza-se de seleção pelo antibiótico zeocina. A linhagem mais utilizada para transformação nesse caso é a X33, capaz de produzir mutantes Mut⁺ ao se realizar a integração do gene de interesse após o promotor AOX1. Além disso, esses vetores plasmidiais permitem a secreção da proteína de interesse para o meio extracelular por meio do fator de secreção alfa. Esse processo ocorre por meio da partícula de reconhecimento de sinal (SRP), a qual se liga ao fator de secreção na proteína nascente exposto na superfície do ribossomo. Em seguida, o complexo ribossomo/proteína nascente/SRP liga-se ao retículo endoplasmático rugoso mediado pelo receptor SR, resultando no desprendimento do SRP do fator de secreção e do ribossomo, e na ligação da proteína à membrana dessa organela celular, onde o fator de secreção é clivado ³⁷. A proteína de interesse, dessa forma, segue o caminho de secreção ao ser transportada ao complexo de Golgi por vesículas secretoras, sendo transportada por fim até a membrana plasmática através do complexo SNARE ³⁸ (Figura.3).

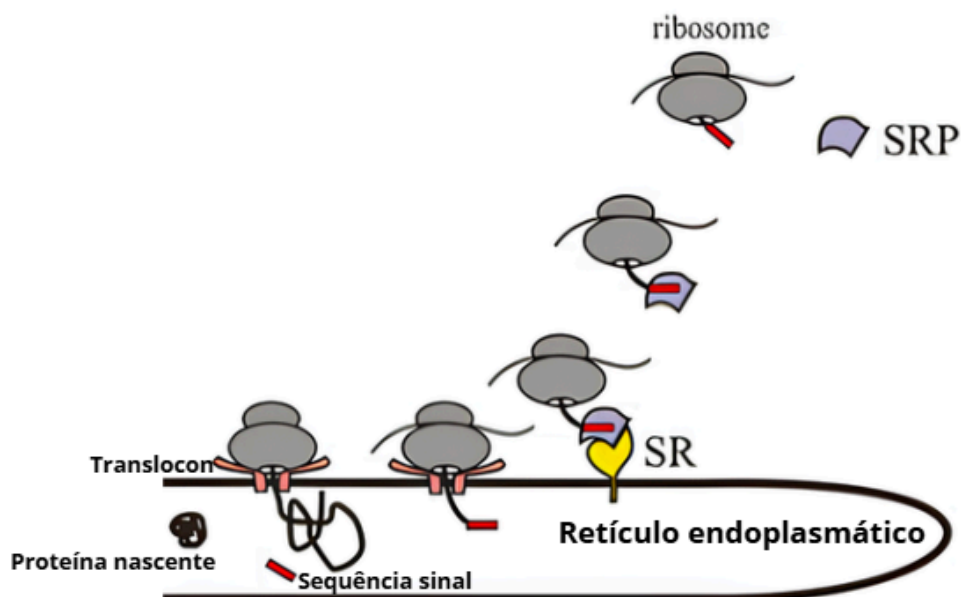


Figura.3. Mecanismo canônico de secreção de proteínas em eucariotos. A secreção da proteína nascente contendo o fator de secreção (em vermelho) ocorre por meio da ligação dessa sequência ao complexo SRP. Esse complexo liga-se ao seu receptor SR (em amarelo), e tem o fator de secreção clivado no retículo endoplasmático. Em seguida a proteína segue ao complexo golgiense por vesículas transportadoras, seguindo o caminho para secreção até a membrana plasmática mediada pelo complexo SNARE. Figura adaptada de Viotti et al., 2016.

Esse vetor plasmidial facilita a purificação e identificação da proteína de interesse pois adiciona uma região de 8 resíduos de histidina ao C-terminal, permitindo a ligação da proteína a colunas cromatográficas, além de identificação da proteína por *Western blot*.

Como alternativa viável, essas enzimas podem ser expressas na bactéria *E. coli* com sucesso, mesmo aquelas oriundas de fungos ou outros eucariotos³⁹. Os principais vetores plasmidiais utilizados nesse caso são do tipo pET, tais como pET-28a e pET-21a. Ambos apresentam seleção por antibióticos, com o vetor pET-28a oferecendo resistência a canamicina e o vetor pET-21a a ampicilina. Para facilitar a purificação da proteína, esses plasmídeos apresentam códons para adição de cauda de histidina ao C-terminal da proteína de interesse.

1.7 Evolução das LPMOs

O aumento do oxigênio molecular atmosférico há 2,4 bilhões de anos pela fotossíntese das cianobactérias impôs aos seres vivos uma condição de sobrevivência totalmente nova⁴⁰.

A utilização do oxigênio para realização de reações químicas que pudessem gerar energia foi de fundamental importância evolutiva⁴¹. É provável que as LPMOs tenham surgido nesse contexto, permitindo a clivagem oxidativa de ligações glicosídicas em polissacarídeos cristalinos recalcitrantes, como quitina e celulose⁴². A grande variedade de famílias de LPMOs já conhecidas leva a debates a respeito da origem e evolução de cada um desses grupos. As sequência de proteínas depositadas em banco de dados é maior para a AA9 (41%), seguido da AA10 (27%), AA11 (14%), AA15 (7%), AA16 (4%), AA13 (1%), AA14 (<0,5%), e ainda outras LPMOs putativas. Com base nessas sequências depositadas, a árvore filogenética de diferentes famílias de LPMOs demonstram similaridade estrutural entre AA16, AA14 e AA11. Isso sugere que o ancestral comum deste ramo evoluiu não apenas para oxidar celulose (AA16s), mas também xilana (AA14s) e até quitina (AA11s). Uma observação semelhante pode ser feita para o próximo ramo, que contém as AA15s e as AA13s⁴³. Dessa maneira, isso sugere que as LPMOs ancestrais evoluíram múltiplas vezes para oxidar uma variedade de substratos. Novos estudos demonstraram que a evolução das LPMOs foi quase exclusivamente impulsionada pela estabilidade redox⁴⁴. Essa estabilidade foi alcançada pela pressão evolutiva para melhor ligação ao substrato, o que reduz as chances de reação de peroxidase fora da via na ausência de substrato e melhora a capacidade de evitar danos resultantes da reação de peroxidase. Nesse mesmo estudo, Eijisink e colaboradores demonstraram por meio da técnica ‘*ancestral sequence reconstruction*’ como evoluíram as LPMOs de AA10 (Figura 4). Dessa maneira, foi possível constatar que as enzimas ativas restritamente sobre celulose ou quitina possuem o mesmo ancestral comum (Anc1) que aquelas enzimas ativas sobre celulose e quitina conjuntamente. O Anc2 deu origem a todas as LPMOs AA10 estritamente quitinolíticas, Anc 3 é o último ancestral comum das enzimas quitinolíticas em gama-proteobactérias e bacilos. Por fim, Anc4 é o último ancestral comum das enzimas quitinolíticas em bactérias bacilos.

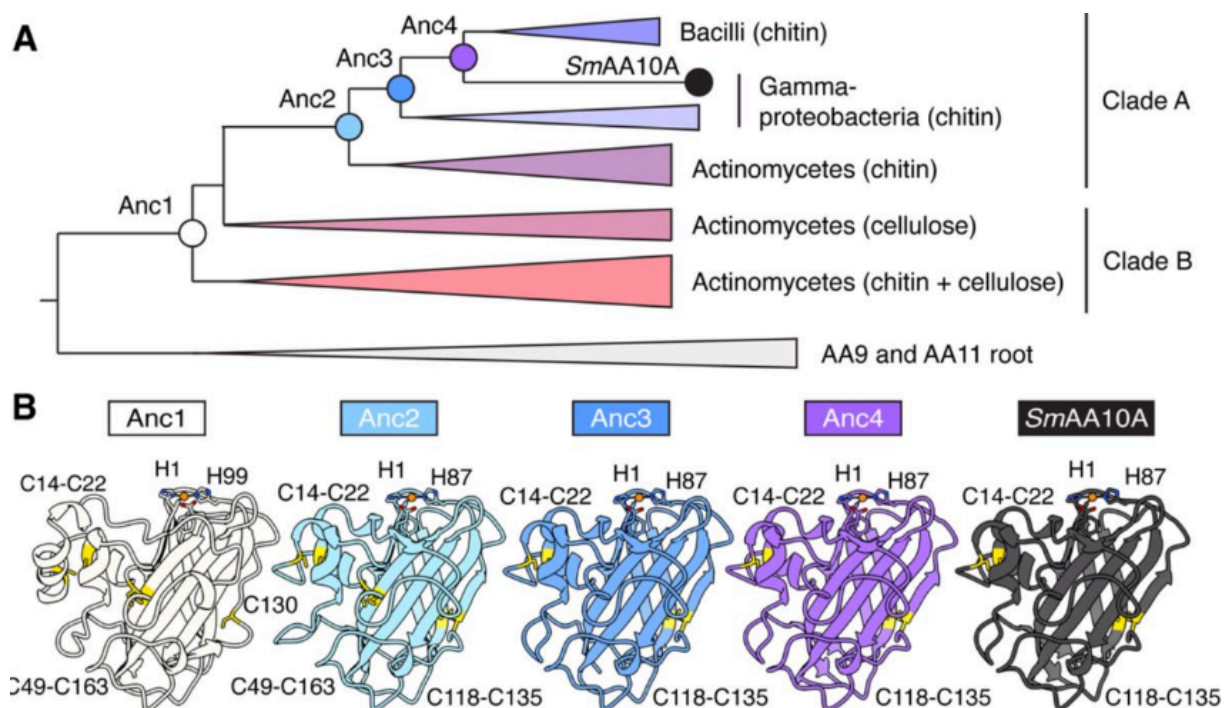


Figura.4. A. Árvore filogenética das LPMOs AA10 construída por meio da técnica ‘ancestral sequence reconstruction’. Anc1: Ancestral comum de todas as LPMOs AA10. Anc2: Último ancestral comum das LPMOs AA10 quitinolíticas. Anc3: Último ancestral comum das LPMOs AA10 das gamaprotobactérias e bacilos. Anc4: Ancestral mais recente da mesma diversificação taxonômica. B. Estrutura tridimensional das LPMOs previstas para construção da árvore filogenética.

1.8 O efeito sinérgico das LPMOs

Pelo fato das LPMOs não serem capazes de liberar diretamente açúcares redutores em quantidades consideráveis, a aplicação dessas enzimas depende de outras glicosidases. Em experimentos utilizando Avicel (celulose microcristalina) como substrato e o coquetel enzimático Celluclast (composto de celulasas de *Trichoderma reesei*), a utilização das LPMOs AA9 de *Thermothielavioides terrestris* e *Thermoascus aurantiacus* foi capaz de aumentar a conversão do substrato em produtos em 10% em um experimento de 24h⁴⁵. Da mesma forma, a utilização de LPMOs de *Myceliophthora thermophila* no substrato PASC (celulose amorfa) foi capaz de aumentar em quase 3 vezes a conversão do substrato quando em sinergismo com celobiohidrolases⁴⁶. Em outro estudo, a utilização da LPMO AfAA9_B de *Aspergillus fumigatus* em conjunto com o coquetel Celluclast foi capaz de aumentar em quase 5% a liberação de açúcares redutores quando comparado ao experimento realizado somente com o coquetel enzimático⁴⁷.

1.9 Expressão de enzimas ativas sobre carboidrato em fungos

Quando submetidos a crescimento em meios de cultura com substratos complexos (tais como braquiária, bagaço de cana e palha de trigo), os fungos tendem a realizar regulação da expressão de enzimas ativas sobre carboidrato de forma diferente quando comparados a crescimentos utilizando fontes de carbono de fácil metabolização, como a glicose^{48,49}. Fatores de transcrição que regulam esse processo já são bem estudados e dividem-se entre fatores ativadores da transcrição (como XlnR, ClrB, Ace2)^{50,51} e repressores da transcrição (como CRE1 e CreA)⁵². Esses reguladores podem atuar de maneira integrada para controlar a resposta metabólica dos fungos na presença ou ausência de açúcares. O fator de transcrição XlnR atua na síntese das principais enzimas xilanolíticas por meio do motivo de ligação ao DNA Zn2Cys6. O fator CreA inibe o gene *xlnr* (codificador de XlnR) ao se ligar à sua região promotora na presença de glicose⁵³. Em dados da literatura, o fungo *Trichoderma reesei* apresentou níveis de transcritos que codificam enzimas degradadoras de parede celular vegetal altos após 24 h de exposição à palha de trigo (aproximadamente 13% do mRNA total). Por outro lado, no fungo *Aspergillus Niger* os transcritos registrados foram maiores ainda (aproximadamente 19% do mRNA total). No entanto, quando esses mesmos fungos foram submetidos ao crescimento em glicose, o fungo *T.reesei* mostrou apenas 1.14% do mRNA total de transcritos de genes relacionados a enzimas ativas sobre carboidrato, e o fungo *A.niger* apenas 3%⁵⁴. As enzimas de atividade auxiliar, como as LPMOs, representam forte regulação positiva em substratos complexos, demonstrando sua importância nesse processo. O fungo termofílico *Thielavia terrestris* crescido em celulose microcristalina (Avicel), apresentou 5 LPMOs entre os 20 transcritos mais expressos de enzimas ativas sobre carboidrato⁵⁵.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Expressão heteróloga de enzimas acessórias do tipo LPMO de atividade auxiliar 9 e 11.

2.2 Objetivos específicos

- I- Verificar a expressão de enzimas auxiliares em *Trichoderma harzianum* ao longo do tempo e em diferentes substratos por PCR em tempo real.
- II- Análise in silico das proteínas LPMOs de *Trichoderma harzianum*.
- III- Expressão heteróloga da LPMO 503 no vetor pET28a na linhagem BL21(DE3).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises computacionais de LPMOs

Para realização do alinhamento das sequências de proteínas LPMOs de atividade auxiliar 9 (AA9), procedeu-se à busca das sequências no banco de dados UniProt. Foram utilizadas para alinhamento apenas as regiões dos domínios ativos das AAs, excluindo-se peptídeos sinais, CBMs e regiões de desordem. O alinhamento foi realizado utilizando o software MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Para construção da árvore filogenética, foi utilizado o software MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11) pela metodologia Maximum Likelihood Tree. O teste de filogenia aplicado foi o método Bootstrap. Para a construção da estrutura tridimensional das LPMO 503 e LPMO 131, utilizou-se o software modeller. Para o refinamento do modelo foi utilizado o software webgalaxy. Como modelo para embasar a construção da estrutura tridimensional da LPMO 503, utilizou-se a LPMO 7P3U (UniProt Code). Como o modelo para construção da estrutura da LPMO 993 utilizou-se a LPMO 502X (UniProt Code) e para o CBM da enzima a LPMO 7YHI (UniProt Code) O mapa contendo as estruturas secundárias foi realizado no software PROCHECK.

3.2 Crescimento do fungo

O fungo *Trichoderma Harzianum* da linhagem TR274 foi crescido em Meio mínimo (0,7% KH₂PO₄, 0,2% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,16% (NH₄)₂SO₄, 1% substrato) durante 8 dias. Utilizou-se como fonte de carbono os substratos glicose, braquiária ou bagaço-de-cana. A cada 2 dias de cultivo, coletou-se o micélio crescido por meio de filtração. Ao final do cultivo, obteve-se 12 amostras de micélios (glicose, braquiária e bagaço-de-cana para 2,4,6,8 dias).

3.3 Extração de mRNA

Os micélios obtidos foram macerados com nitrogênio líquido e foram submetidos imediatamente ao processo de extração de RNA total com TRIzol® conforme protocolo fornecido pelo fabricante. A qualidade da amostra obtida foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. A concentração da amostra foi quantificada por NanoDrop® 2000.

3.4 Transcrição reversa

Para realizar a transcrição reversa utilizou-se a enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase conforme protocolo do fabricante. Foi utilizado 5 ug de RNA total na reação. Para a eliminação de resquícios de RNA na amostra de cDNA, adicionou-se 1 uL de RNase H ao final do experimento.

3.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

O cDNA obtido na etapa anterior foi amplificado usando cada um dos 5 pares desenhados para cada gene. A enzima GoTaq® foi utilizada nesse experimento. Por serem genes ricos em conteúdo GC (~60%), optou-se por utilizar o agente desnaturante Dimetil Sulfóxido (DMSO). O protocolo de PCR consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 2m30s, seguida de 35 ciclos: (95°C 20s, diferentes temperaturas de anelamento a depender do gene 20s, 72°C 2m30s), finalizando com uma etapa final de 72°C por 5 min. Os amplicons obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Gene	Primer F	Primer R	Temperatura de anelamento (c°)
44837 4	(5'-ATTAGAATTCAGGACAGATCCA AAA-3')	(5'-ATTAGCGGCCCGCCTAGCCTTGCC ACA-3')	50°C
63047	(5'-ATTACTCGAGCAGATGAAAAG CC-3')	(5'-ATTAGAATTCCTTGTCACCAAGG TGA-3')	52°C
77405	(5'-ATTACTCGAGACCAACCCTGTC CC-3')	(5'-ATTAGAATTCCTTAAGCACGAATG C-3')	50°C
13110 8	(5'-ATTAGCGGCCGCACTTCTTTTA CAAC-3')	(5'-ATTAGAATTCCTACTCCTTCTCTT C-3')	52°C
50319 7	(5'-ATTAGAATCCCCGAGGCTCTG CGA-3')	(5'-ATTAGCGGCCGCTTACACGTTCA AAGG-3')	52°C

Tabela 2. Sequência e temperatura de anelamento dos primers utilizados para amplificação dos genes de LPMO de *Trichoderma harzianum*.

3.6 Clonagem no vetor pGEM®-T Easy

Os amplicons obtidos na reação de PCR dos genes 131 e 503 foram clonados no vetor pGEM®-T Easy conforme as instruções do fabricante. A proporção inserto:plasmídeo utilizada foi a 3:1. A reação de ligação foi deixada à 4°C *overnight*. No dia seguinte, o plasmídeo obtido foi transformado em células XL-10-GOLD por choque térmico, as quais foram plaqueadas em meio LB-Ágar com ampicilina e deixadas para crescer à 37°C *overnight*. As colônias XL-10-Gold-pGEM®-T Easy-131 e XL-10-Gold-pGEM®-T Easy-503 que cresceram na placa foram transferidas para meio LB-Ampicilina líquido e crescidas a 37°C a 200 rev.min⁻¹ por 24 horas em 10 mL acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. A cultura foi posteriormente centrifugada e as células foram submetidas à extração plasmidial com kit Invitrogen™ PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit. Para confirmação da presença do inserto no plasmídeo, foi realizada digestão dupla com enzimas NotI/EcoRI.

3.7 Subclonagem no vetor pPic9

Foi realizada a purificação da digestão dupla correspondente ao fragmento de interesse conforme o protocolo do Kit de eluição *ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System*. As amostras quantificadas foram ligadas ao vetor utilizando a proporção 5:1 com a enzima T4 ligase Promega (4°C *overnight*). Células XL-10-GOLD foram transformadas com o plasmídeo contendo o inserto de interesse por choque térmico. As células transformadas foram selecionadas por plaqueamento em meio LB-Ampicilina e crescidas em meio LB-Ampicilina líquido a 37°C a 200 rev.min⁻¹ por 24 horas em 10 mL acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. Para confirmação da presença do inserto, procedeu-se a uma digestão dupla com as enzimas NcoI/XhoI.

3.8 PCR de colônia em células da linhagem XL-10-GOLD

Para confirmação de células bacterianas corretamente transformadas por choque térmico, foi realizada PCR de colônia nas colônias crescidas em meio LB com ampicilina. Dessa maneira, cada colônia a ser testada foi diluída em 10 uL de água Milli-Q. O volume de 1 uL é então coletado dessa diluição e utilizado para reação de PCR convencional. A etapa inicial de desnaturação a 95°C ocorre pelo tempo de 7 minutos, permitindo a lise celular e liberação do DNA plasmidial contendo o gene de interesse. A PCR foi realizada utilizando-se os primers específicos para amplificação do gene completo, assim como os primers flanqueadores da região AOX.

3.9 Síntese de plasmídeos

Os plasmídeos contendo os genes *triha503197* e *triha99387* foram sintetizados quimicamente por uma empresa especializada devido a dificuldade de clonagem desses genes pela metodologia tradicional.

3.10 Transformação em *Komagataella phaffii*

As células XL-10-GOLD-pPic9-LPMO131 e XL-10-GOLD-pPic9-LPMO503 foram novamente crescidas em meio LB-Ampicilina líquido e foi realizada uma Miniprep com o kit Invitrogen™ PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit conforme o protocolo do fabricante. 5 µg do plasmídeo obtido foram digeridos com a enzima SacI à 37°C overnight. A construção foi precipitada utilizando-se acetato de sódio e etanol puro gelado. A amostra foi ressuspensa em 10 µL de água bidestilada. Em seguida, 80 µL de células GS-115 competentes foram transformadas por eletroporação de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante da linhagem (Pichia expression. Kit, Invitrogen) e plaqueadas em meio MD sem Histidina para seleção de transformantes. Para confirmação dos clones, realizou-se PCR de colônia em diferentes condições, utilizando-se NaOH para rompimento da parede celular da levedura. Dessa forma, a colônia coletada foi diluída em 10 uL de solução 0,02M de NaOH, incubada por 10 min. à 95°C. Foi adicionado a PCR convencional 5 uL desse tratamento. O par de primers utilizados flanqueiam a região AOX1 na qual o gene de interesse está inserido.

3.11 Expressão protéica em *K. phaffii*

Para expressão da enzima heteróloga, as colônias de *K. phaffii*-GS115-pPIC9-LPMO131 e *K. phaffii*-GS115-pPIC9-LPMO503 foram crescidas em BMGY (em p/v: 1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB-sem aminoácidos, 4×10^{-5} % biotina, e 1% (v/v) glicerol, tamponado com Fosfato de sódio 100 mM pH 6,0) por 48 horas. O meio de cultivo com as células foi centrifugado a 10^4 g por 10 minutos e o pellet foi ressuspensionado em 50 mL de meio BMMY (em p/v: 1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB-sem aminoácidos, 4×10^{-5} % biotina, tamponado com Fosfato de sódio 100 mM pH 6,0) para expressão da proteína heteróloga. A adição de metanol para induzir a expressão somente foi iniciada após o meio de cultivo atingir a OD de 10. Após atingir essa densidade celular, foi adicionado 0,5% de metanol por dia, durante 4 dias. Também foi testada a expressão da proteína heteróloga LPMO 131 em meio mínimo (1,34% YNB-sem aminoácidos, 4×10^{-5} % biotina e 0,5% metanol por dia). Para coleta dos sobrenadantes, os inóculos foram centrifugados para retirar as células e foi adicionado PMSF (1 mM) e azida sódica (0,01% p/v).

3.12 Análise do perfil de expressão de clones de *K. phaffii* por SDS-PAGE

Para determinação do perfil de expressão de proteínas, foi realizado um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na concentração de 15%. As amostras foram precipitadas com TCA/acetona utilizando-se 5 mL de sobrenadante do cultivo em BMMY e meio mínimo. A condição desnaturante foi obtida ao adicionar 20 μ L de tampão de amostra e aquecer a amostra a 95°C por 10 minutos.

3.13 Tripsinização e Espectrometria MALDI-TOF para identificação proteica

Após a preparação e corrida do gel SDS-PAGE, as bandas de tamanho esperado foram cortadas com estilete higienizado com metanol para identificação por espectrometria. Para tanto, logo após a coleta, as bandas do gel foram lavadas com 150 μ L de solução de acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e agitadas em vórtex por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e esse processo repetido até que o gel ficasse transparente. Aos tubos com essas amostras, foram adicionados 100 μ L de acetonitrila 100% e as amostras

incubadas por 5 minutos com agitação. Em seguida, foram adicionados 40 µl de uma solução de 10 mM de DTT em 25 mM de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃). As amostras foram agitadas em vórtex e mantidas a 56 °C por 1 hora. O sobrenadante foi retirado e adicionados 40 µl de iodoacetamida 55 mM. As amostras foram deixadas por 45 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. O sobrenadante foi novamente descartado, e foram adicionados 100 µl de bicarbonato de amônio 25 mM com 10 minutos agitando em vórtex. O sobrenadante foi novamente descartado, e foram adicionados 100 µl de solução de bicarbonato de amônio 25 mM em 50% de acetonitrila, agitando em vórtex por 5 minutos. Essa mesma lavagem foi repetida. As amostras foram secadas em Speed vaccum. Em seguida, foram adicionados 15 µl de solução de tripsina 10 ng/µl, deixando reidratar no gelo por 15 minutos. O próximo passo foi a adição de 80 µl de bicarbonato de amônio 25 mM. As amostras foram deixadas por 16 h à 37 °C. A solução foi retirada dos tubos e colocada em tubos novos. Foram adicionados 50 µl de acetonitrila 100% com 5% de TFA aos pedaços de géis, os quais foram agitados em vórtex por 10 minutos. A solução foi coletada e passada para o tubo contendo a solução da digestão. Esse processo foi repetido. Ao final, todo o líquido contendo a proteína digerida foi secado em Speed vaccum. Para a introdução da amostra no espectrômetro, o pellet resultante foi ressuspendido em 20 µl de água milliQ. Em um tubo novo, foi pipetado 3 µl de matriz (50% de acetonitrila/0,3% TFA) e 1 µl de amostra. Na placa, foram pipetados 1 µl dessa mistura para ionização. Os picos da espectrometria obtidos foram analisados pelo software MASCOT.

3.14 Clonagem do gene triha503197 em pET-28a(+)

O gene *triha503197* foi clonado no vetor pET-28a(+) a partir do vetor PPIC9-LPMO503. Para tanto, 500 ng do vetor contendo o gene de interesse em PPIC9 foram digeridos com as enzimas NotI e EcoRI a 37°C, por 12 horas. Foi realizada a purificação do fragmento de interesse liberado pela digestão dupla conforme o protocolo do Kit de eluição *ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System*. O vetor e o inserto digeridos foram ligados utilizando a proporção 3:1 com a enzima T4 ligase Promega a 4°C overnight. No dia seguinte, o plasmídeo obtido foi transformado em células da linhagem XL-10-GOLD para produção de estoque de células transformadas por choque térmico. A confirmação da inserção do gene de interesse no vetor plasmidial foi realizada por digestão dupla com as enzimas NotI e EcoRI a 37°C, por 12 horas. Após miniprep para obtenção do vetor recombinante, a linhagem BL21(DE3) foi transformada por choque térmico, plaqueada em meio LB-Ágar

com canamicina e deixada para crescer à 37°C *overnight*. Para teste de expressão da proteína, foram induzidos 5 diferentes clones crescidos em placa.

3.15 Expressão do gene triha503197 em BL21(DE3)

A expressão proteica foi realizada cultivando o clone BL21(DE3)-pET28A-LPMO503 em 100 mL de meio Terrific Broth autoindutor (TB auto) (12 g/L de triptona, 0,15 g/L de MgSO₄, 6,5 g/L de KH₂PO₄, 24 g/L de extrato de levedura, 3,3 g/L de (NH₄)₂SO₄, 7,1 g/L de Na₂HPO₄, 2,0 g/L de α -lactose, 0,5 g/L de glicose) em shaker ajustado a 28 °C, 200 rev/min, por 16 horas. Após o tempo de crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 10000×g por 20 min a 4 °C, ressuspensas em 10 mL de tampão Fosfato de Sódio 50mM, pH 6,4, sonicadas [amplitude de 40% por 5 minutos (ciclos de 30 segundos liga/desliga) (SONICS® Vibra-Cell™ VC 750, EUA)], acrescidas de 10mM de PMSF. O sobrenadante contendo a proteína solúvel foi coletado por centrifugação. A fração insolúvel também foi coletada para testes posteriores.

3.16 Purificação da proteína LPMO503 por His-Tag

A purificação da proteína heteróloga foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando coluna de HisTrap HP 5 mL (Cytiva). O procedimento foi conduzido no equipamento ÄKTA Pure (GE Healthcare), utilizando os tampões: LEW (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7,4) para o equilíbrio da coluna e LEW com Imidazol (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,4) para a eluição. A coluna foi equilibrada com 50 mL de tampão LEW, volume equivalente a 10 vezes o volume da coluna. As amostras foram aplicadas no sistema a um fluxo de 2 mL por min. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 10 vezes o volume da coluna, utilizando 8% de tampão LEW com 250 mM de imidazol. A etapa de eluição foi realizada com tampão LEW contendo 250 mM de imidazol, em um gradiente linear de 8% a 100%. As frações de proteína obtidas durante a eluição foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE.

3.17 Western Blot da proteína LPMO503

Para a realização de Western Blot foi utilizada a membrana Amersham Protran 0,45 μm NC (Cytiva). A transferência foi realizada a 25 V e 1,3 A por 7 min no equipamento Power Blotter XL (Invitrogen). Após a transferência, a membrana foi incubada por 45 min em solução de bloqueio (5% (m/v) de leite em pó desnatado Molico em TBS 1X), sob agitação leve, à temperatura ambiente. O TBS 1X foi preparado pela diluição do TBS 10X (60,6 g/L de Tris-base e 87,7 g/L de cloreto de sódio). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal Anti-HIS Tag produzido em camundongo – Sigma Aldrich), diluído na proporção de 1:3000 em solução (1% (m/v) de leite em pó 52 desnatado Molico em TBS 1X), por 45 min em agitador orbital a 37 °C, a 60 rpm. Após essa incubação, a membrana foi lavada três vezes por 5 min com TBS 1X contendo 0,05% (v/v) de Tween 80. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário (anticorpo Pierce Goat AntiMouse IgG (H+L), conjugado com fosfatase alcalina – ThermoFisher Scientific), diluído na proporção de 1:5000 em solução (1% (m/v) de leite em pó desnatado Molico em TBS 1X), e incubado por 45 min sob as mesmas condições. A membrana foi revelada com o reagente Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega), conforme as instruções do fabricante.

3.18 Análise da expressão de LPMOs por qPCR

O RNA total obtido do fungo crescido em bagaço-de-cana, braquiária e glicose por 2,4,6 e 8 dias foi utilizado para transcrição reversa com a enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase conforme protocolo do fabricante. O cDNA então foi utilizado para realização de qPCR utilizando o reagente iTaq Universal SYBR Green Supermix™ conforme protocolo do fabricante. A quantidade de cDNA utilizada por reação foi de 100 ng. Os primers utilizados para cada um dos genes de interesse, assim como a sequência de primers para os genes de referência, estão contidos na tabela 2. As temperaturas utilizadas durante o ciclo foram 95°C para desnaturação, 57°C para anelamento de primers e 72°C para extensão, por 35 ciclos. Posteriormente, programou-se a máquina para realização de curva de melting. O Software utilizado para obter os parâmetros de qualidade dos genes de referência foi o qBase+. A expressão relativa foi avaliada com a metodologia delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)

Gene	Primer F	Primer R	TM
448374	(5'-TGAGGCTTGATGGGATCTTTAC --3')	(5'- ACTTTGAGCGAAAGGGAAGAG3')	62°C
63047	(5'- ATGAAGCTCACCGAGACAATC-3')	(5'-CATCCGCCTATGTACGACTTAA T-3')	62°C
77405	(5'-CCAAGGAATTGGAGTCTGGTA A3')	(5'-CCAAGGAATTGGAGTCTGGTA A-3')	62°C
131108	(5'-AACCCAATCCATCCATCAC-3')	(5'-GCGACCTGTAGCAAGATCAA-3)	62°C
503197	(5'- GACCTTCATTGTGCTGATTGTG3')	(5'-CCACCCTTCCATTGGATCTAT- 3')	62°C
Actina	(5'-CGACAATGGTTCCGGTATGTGC A-3')	(5'-ACGTAGGAGTCCTTCTGACCC AT-3')	63°C
a-Tubulina	(5'-TATCTGCTACCAGGCTCCCGAG A-3'	(5'-TGGTGTTGGACAGCATGCAGA CA-3')	65°C

Tabela 3. Sequência e Tm dos primers utilizados para amplificação dos genes de LPMO de *Trichoderma harzianum* por qPCR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelos tridimensionais das LPMOs 503 e 993

4.1.1 Modelagem da LPMO 993

A análise computacional da estrutura tridimensional da LPMO 993 detalha a tríade de aminoácidos que coordenam a ligação do cobre ao sítio ativo. O resíduo His1 se liga ao átomo de cobre pelo nitrogênio do grupamento amina no N-terminal da proteína a uma distância de 2,2 Å, e o nitrogênio do grupamento imidazol do mesmo resíduo de aminoácido está a uma distância de 1,9 Å do átomo de cobre. A His86 faz parte do ‘histidine brace’ e se liga ao cobre pelo nitrogênio do anel imidazol a uma distância de 2,4 Å. O resíduo Tyr174, por sua vez, se liga ao átomo de cobre também pelo nitrogênio do anel imidazólico a uma distância de 2,9 Å (Figura.5,A e B).

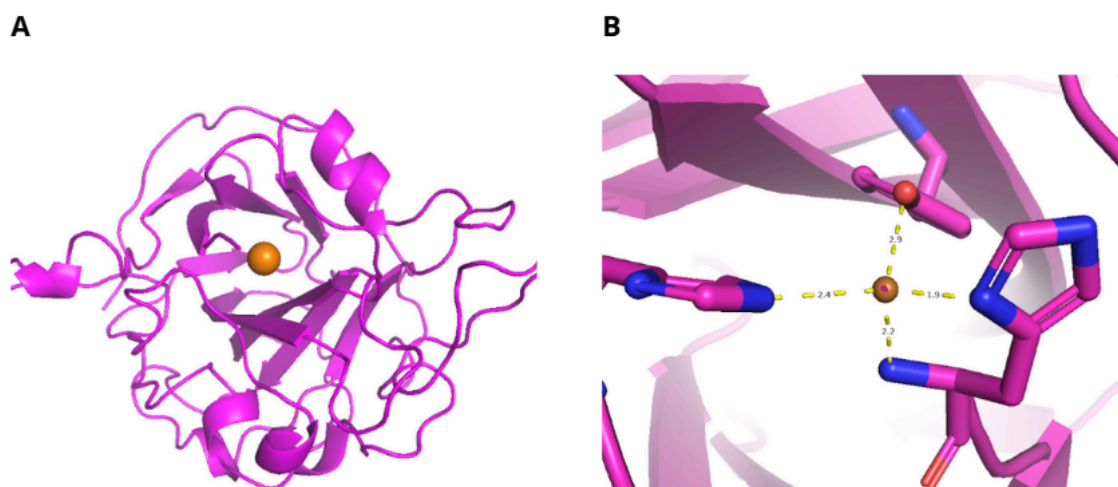


Figura.5. Modelo tridimensional da LPMO 993. Em A está representada a estrutura tridimensional da enzima com o cobre posicionado em seu sítio ativo. Em B está indicado com detalhes o ‘histidine brace’ e a tirosina que realizam a coordenação do átomo de cobre no sítio ativo.

O estudo das estruturas secundárias da LPMO 993 apresentou 14 folhas beta-pregueadas e 5 alfa-hélices. É possível observar a formação de duas pontes dissulfetos, uma formada entre uma folha beta e uma alfa hélice entre a Cys56 e Cys177 e outra formada entre a Cys97 e a Cys101. Essa mesma proteína ainda apresenta um módulo de ligação a carboidrato (CBM1). (Figura.6). Esse módulo é predominante em fungos, e já é bem

conhecido por atuar direcionando os domínios catalíticos para o substrato insolúvel, aumentando a concentração local de celulases ⁵⁶.

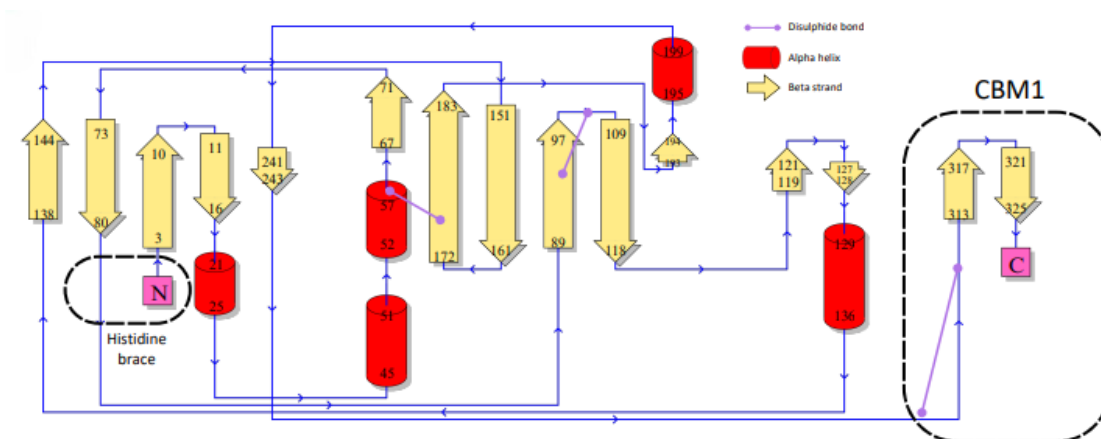


Figura.6. Esquema de previsão de estruturas secundárias da LPMO 993. As setas amarelas indicam folhas-beta pregueadas, os cilindros vermelhos representam estruturas de alfa-hélice, e os traços lilás apresentam a formação de pontes dissulfeto. As áreas tracejadas indicam a localização do ‘histidine brace’ e do módulo de ligação a carboidrato 1 (CBM1).

4.1.2 Modelagem da LPMO 503

A modelagem da LPMO 503 revelou a presença de um sítio ativo mais distanciado do núcleo composto pelas folhas beta-pregueadas que a LPMO 993. O resíduo His1 se liga ao átomo de cobre pelo grupamento amina do N-terminal e também pelo nitrogênio do grupamento imidazol do mesmo resíduo de aminoácido. A His74 e a Tyr136 coordenam o átomo de cobre no sítio ativo por meio do nitrogênio do grupamento imidazol (Figura.7).

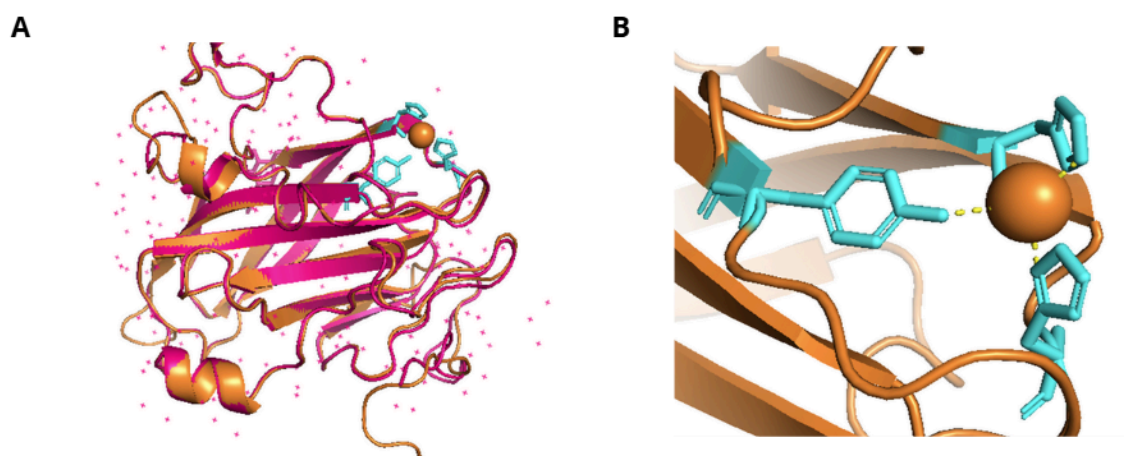


Figura.7. Modelo tridimensional da LPMO 503. Em A está representada a estrutura tridimensional da enzima com o cobre posicionado em seu sítio ativo. Em B está indicado com detalhes o ‘histidine brace’ e a tirosina que realizam a coordenação do átomo de cobre no sítio ativo.

O esquema que mostra as estruturas secundárias da LPMO 503 apresentou 9 folhas beta-pregueadas e 4 alfa-hélices. Os resíduos His1, His74 e Tyr136 compõem o ‘histidine brace’ para coordenação do átomo de cobre no sítio ativo. O aminoácido Cys39 localizado em uma alfa-hélice, liga-se ao resíduo Cys119 localizado em uma alfa-hélice por ponte dissulfeto (Figura.8). O resíduo 184 até o C-terminal dessa proteína apresenta uma região de desordem. Evidências experimentais demonstraram que tais regiões de desordem podem induzir a dimerização das LPMOs mediada por pontes dissulfeto, modulando positivamente a ligação à celulose. Isso possui um grande impacto na penetração de fungos fitopatogênicos em plantas ⁵⁷. O papel fundamental dessas enzimas oxidativas secretadas na patogenicidade é corroborado por estudos de deleção gênica e sua ampla ocorrência em patógenos fúngicos.

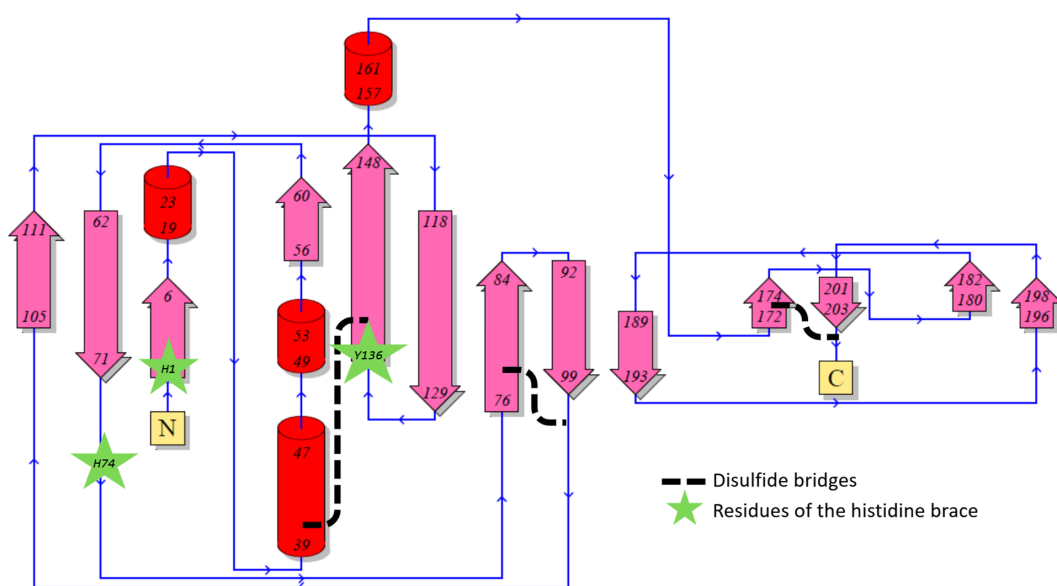


Figura.8. Esquema de previsão de estruturas secundárias da LPMO 503. As setas magenta indicam folhas-beta pregueadas, os cilindros vermelhos representam estruturas de alfa-hélice, as linhas tracejadas mostram pontes dissulfeto, e as estrelas verdes apontam os resíduos constituintes do 'histidine brace'.

4.2 Construção da árvore filogenética de LPMOs de atividade auxiliar 9 (AA9)

A construção da árvore filogenética das LPMOs AA9 revelou o agrupamento de 4 grandes grupos de enzimas de acordo com sua regiosseletividade. No topo da árvore, foram agrupadas as enzimas de regiosseletividade C1,C4. Nesse grupo estão contidas a LPMO 993 e LPMO 448 de *T. Harzianum* (Figura.9). Apesar dessas proteínas possuírem a mesma regiosseletividade e serem oriundas do mesmo microrganismo, elas se encontram relativamente distantes, em clados distintos. Isso pode indicar o surgimento dessas enzimas em ancestrais diferentes, ou seja, cada uma dessas enzimas teve um último ancestral comum distinto, que recebeu mutações para construir as atuais configurações polipeptídicas dessas proteínas. Apesar disso, é possível observar que as enzimas que mais se aparentam a LPMO 993 são oriundas do gênero *Trichoderma*, apresentando muitas regiões conservadas entre si. Ao contrário das enzimas LPMOs AA11 (degradadoras de quitina) que estão relacionadas ao combate de fungos micoparasitas, as LPMOs AA9 estão relacionadas à função saprofítica desse fungo, o qual utiliza a matéria orgânica vegetal morta para obtenção de energia. Nesse sentido, a LPMO 448 também se agrupa junto a outras LPMOs do gênero *Trichoderma*, no

entanto, apresenta grande similaridade a algumas enzimas do fungo fitopatogênico *Leptosphaeria maculans*.

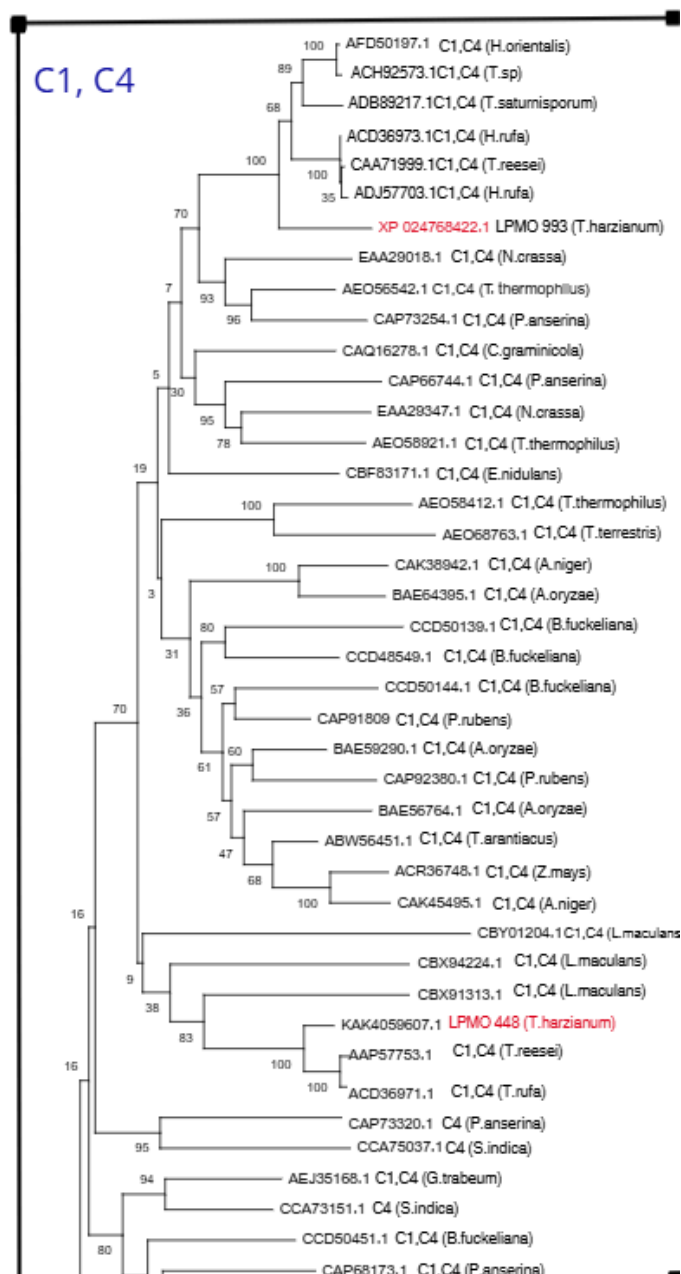


Figura.9. Árvore filogenética que agrupa as LPMOs de atividade auxiliar 9 de regiosseletividade C1,C4. Em vermelho são representadas as LPMOs 993 e 448 de *Trichoderma harzianum*.

Por outro lado, a LPMO 131 se agrupou com LPMOs de regiosseletividade C4 (Figura.10). Os fungos que mais apresentaram enzimas semelhantes à de *T.Harzianum* foram *Asperigillus oryzae* e *Thermothelomyces thermophilus*. O fungo *A.oryzae* foi domesticado há mais de 2 mil anos, e é utilizado comumente nos processos fermentativos para produção de feijão, produção de bebidas alcoólicas como o saquê e a sacarificação do arroz ⁵⁸. Da mesma forma, o fungo *T.thermophilus* possui potencial para produção de biocombustíveis por meio da hidrólise da biomassa vegetal ⁵⁹. A presença de enzimas acessórias com grande similaridade entre esses fungos e as enzimas de *T. Harzianum* pode indicar o potencial de aplicação das enzimas auxiliares do gênero *Trichoderma* em processos biotecnológicos, como na produção de biocombustíveis.

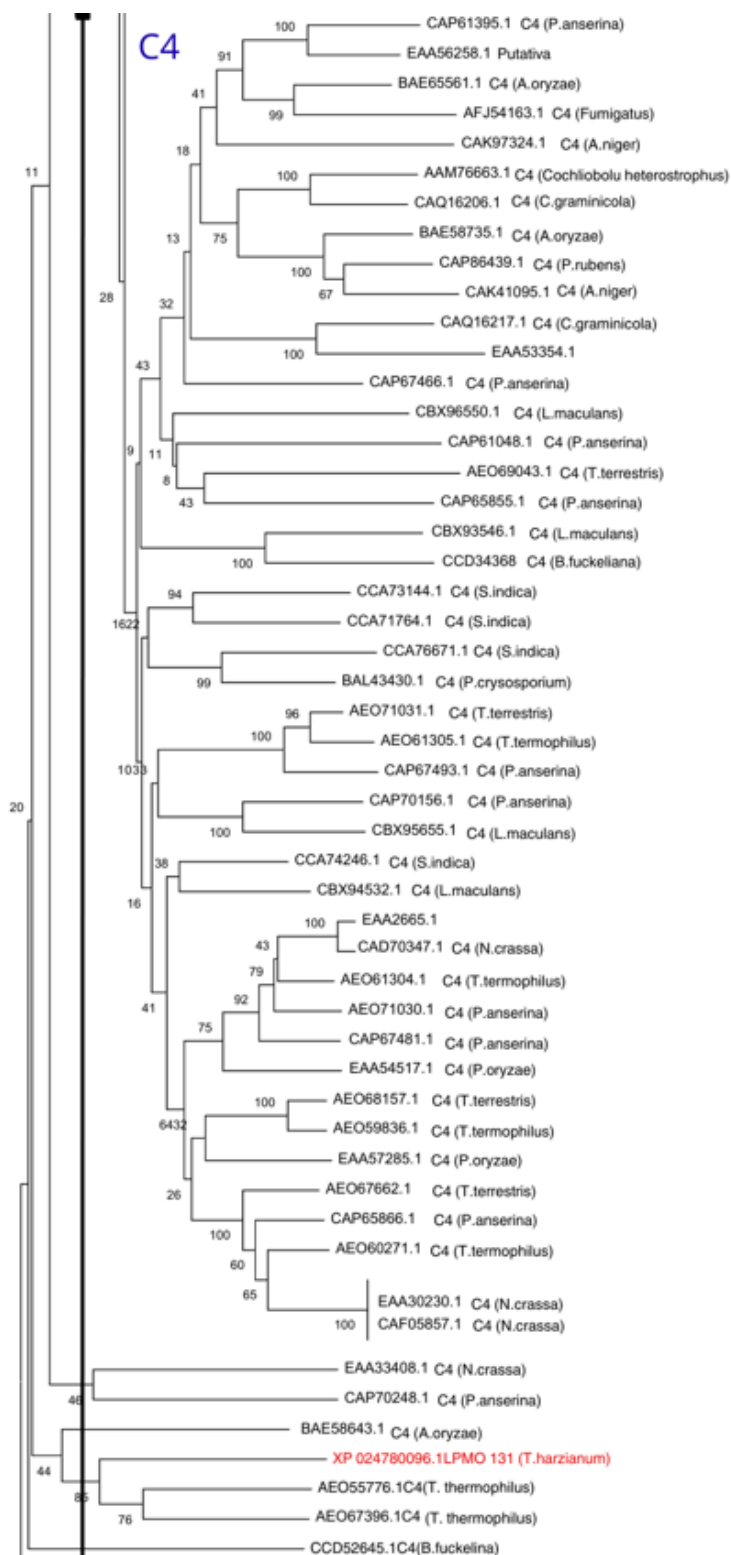


Figura.10. Árvore filogenética que agrupa as LPMOs de atividade auxiliar 9 de regiões de atividade C4. Em vermelho está representada a LPMO 131 de *Trichoderma harzianum*.

4.3 Alinhamento das sequências de LPMOs AA9

Para determinação de regiões conservadas das LPMOs de *T. Harzianum*, procedeu-se o alinhamento dessas sequências juntamente a outras LPMOs semelhantes já caracterizadas. O alinhamento das LPMO 488 e 993 foi útil para determinar os 3 resíduos do ‘histidine brace’ dessa proteína, além do sítio de ligação à oxigênio (Figura.11). As caixas vermelhas 1 e 2 indicam o resíduo de histidina conservado para ligação ao cobre. Ao lado da caixa 2, está indicado por uma seta azul o resíduo de prolina conservado em todas as LPMOs, este resíduo é uma característica das LPMOs oxidantes mistas C1/C4, enquanto os oxidantes estritos C1- ou C4 têm um resíduo Tyr ou Ala/Asp nesta posição, respectivamente ⁵⁷. A caixa 3 detalha o sítio de ligação ao oxigênio molecular, o qual reduz o átomo de cobre ligado no sítio ativo. A caixa 4 mostra o resíduo de tirosina que completa a tríade de aminoácidos coordenadores do átomo de cobre no sítio ativo. Por fim, a caixa vermelha contendo um asterisco (*) para indicar a asparagina conservada que recebe glicosilação, e é útil para determinação da regiosseletividade C1/C4. O grande número de enzimas já caracterizadas, permite deduzir que os oxidantes C1/C4 frequentemente possuem um N-glicano na superfície plana ativa, enquanto tal glicosilação está ausente ou localizada em outro lugar na proteína para oxidantes C1 ou C4 estritos ^{60,61}.

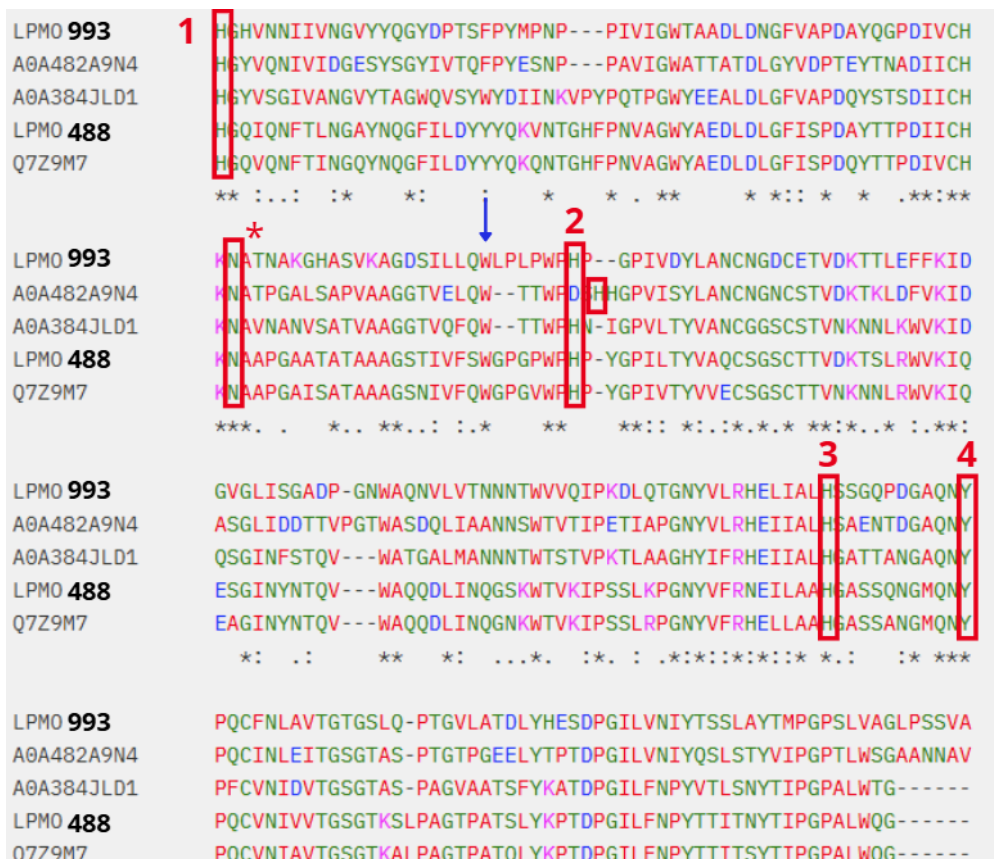


Figura.11. Alinhamento LPMOs 993 e 488 com enzimas caracterizadas. As caixas vermelhas 1,2 e 4 indicam os resíduos do ‘histidine brace’. A caixa vermelha 3 mostra o sítio de ligação ao oxigênio molecular. A caixa com asterisco evidencia o resíduo de asparagina conservado que pode determinar a regioselectividade da enzima. A seta azul indica o resíduo de prolina conservado em LPMOs de regioselectividade C1/C4.

A LPMO 131 possui menor similaridade do que as outras LPMOs AA9 de *T.harzianum*. Por esse motivo, a sequência dessa proteína foi alinhada a outras enzimas caracterizadas diferentes daquelas utilizadas no alinhamento anterior, as quais apresentam maior homologia com a proteína analisada. As caixas vermelhas 1 e 2 apresentam os resíduos de histidina que compõem o ‘histidine brace’, a caixa 3 apresenta um sítio de ligação da proteína ao oxigênio molecular, e a caixa 4 evidencia o resíduo de tirosina que completa a coordenação do átomo de cobre ao sítio ativo (Figura.12)

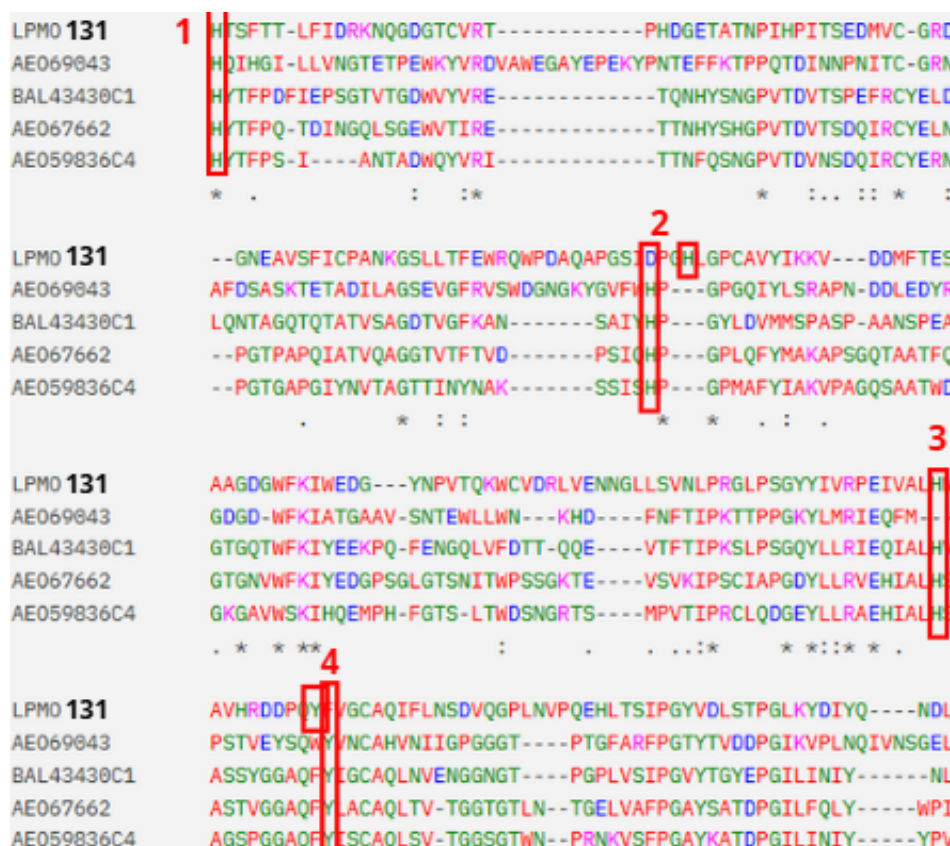


Figura.12. Alinhamento LPMO 131 com enzimas caracterizadas. As caixas vermelhas 1,2 e 4 indicam os resíduos do ‘histidine brace’. A caixa vermelha 3 mostra o sítio de ligação ao oxigênio molecular.

4.5 Construção da árvore filogenética de LPMOs de atividade auxiliar 11 (AA11)

A construção da árvore filogenética das LPMOs AA11 foi capaz de demonstrar a similaridade estrutural entre as enzimas de *T.harzianum* e *T.reesei*, com cada espécie apresentando a mesma versão da enzima com pequenas diferenças estruturais (Figura 14). Além do mais, comparando-se as enzimas contidas no banco de dados Uniprot de códigos B0XZD3 e Q2UA85 utilizadas no alinhamento anterior, foi possível constatar maior similaridade estrutural entre as LPMOs 630 e 503 com a LPMO B0XZD3 de *Aspergillus fumigatus*, ao passo que a LPMO 774 apresenta maior semelhança a LPMO Q2UA85 de *Aspergillus oryzae*. Essas características sugerem que cada uma das 3 enzimas LPMOs de *T.harzianum* surgiram de forma independente em ancestrais comuns, conservando-se ao longo das gerações em diferentes espécies. A presença ampla de LPMOs AA11 em fungos saprofiticos abre debate sobre a função dessa família de enzimas. Fungos como *T.harzianum* que realizam micoparasitismo, podem ter a função dessas moléculas relacionadas a degradação da parede celular dos outros fungos, por outro lado, microrganismos que decompõem a matéria orgânica morta, não possuiriam função evidente em um primeiro momento. Estudos mais recentes avaliaram o domínio funcional da enzima AfAA11A de *Aspergillus fuimigatus*, o que demonstrou o papel dessa família na renovação da quitina fúngica, em um processo denominado ‘*quitin turnover*’⁶². Esse é um processo contínuo pelo qual o fungo quebra partes da sua própria quitina e reconstrói outras partes conforme cresce, diferencia-se ou muda de ambiente. Isso indica que muito além de ferramenta molecular para parasitismo de outros fungos ou insetos, as LPMOs AA11 apresentam função primordial na própria fisiologia do microrganismo.

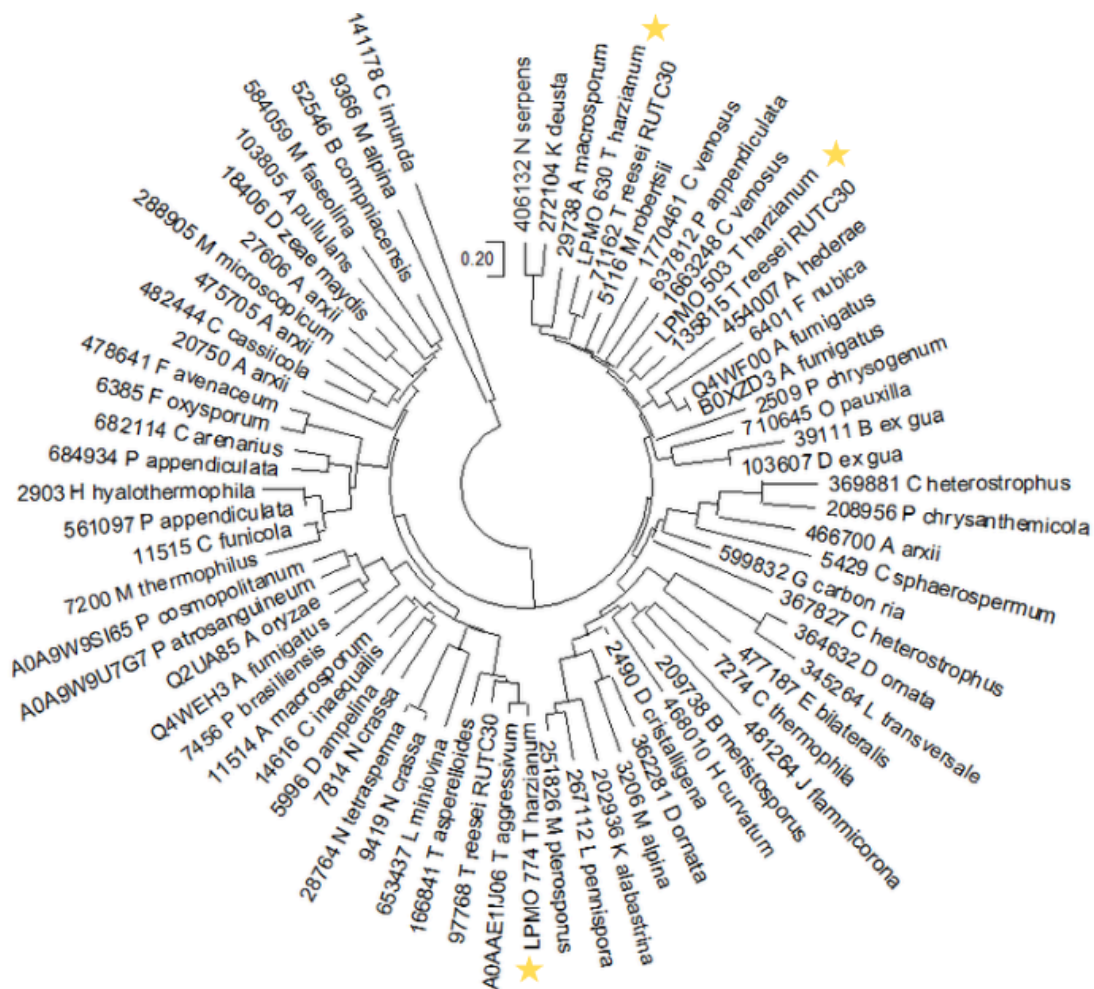


Figura.14. Árvore filogenética circular das LPMOs AA11. As estrelas amarelas apresentam as LPMOs de *T. harzianum* avaliadas no presente trabalho.

4.6 Clonagem dos genes *trih131108* e *trih503197* por metodologia tradicional

A extração de RNA total do fungo crescido em glicose nos dias 2 e 6 resultou nas extrações com a melhor qualidade de RNA, sendo possível visualizar as bandas de RNA ribossomal 28S, 18S e 5S (Figura.15). Dessa forma, essas amostras foram escolhidas para prosseguir no processo de transcrição reversa e clonagem.

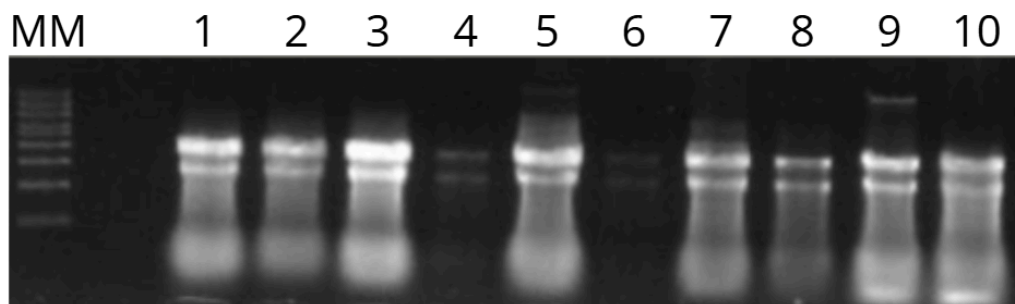


Figura.15 Gel de eletroforese da extração de RNA total com Trizol. Os poços de 1 a 3 contém o material genético extraído de micélios do fungo crescido em glicose por 2 dias. Os poços de 3 a 6 possuem o material genético extraído de micélios do fungo crescido em glicose por 4 dias. Os poços 7 a 10 possuem o material genético extraído de micélios do fungo crescido em glicose por 6 dias.

A amplificação por PCR dos genes 503 e 131 ocorreu em tamanho esperado, com 655 bp para o gene 503 (Figura.16) e 1073 bp para o gene 131 (Figura.17) somente após a utilização do reagente DMSO. Esse agente químico é reconhecidamente eficaz para aumentar a eficiência das reações de PCR que pretendem amplificar genes com alto conteúdo GC, uma vez que a capacidade desnaturante do DMSO facilita a quebra das ligações de hidrogênio triplas entre a guanina e citosina⁶³. O conteúdo de guanina e citosina dos genes de LPMO de *T. harzianum* são mostrados na tabela 3.

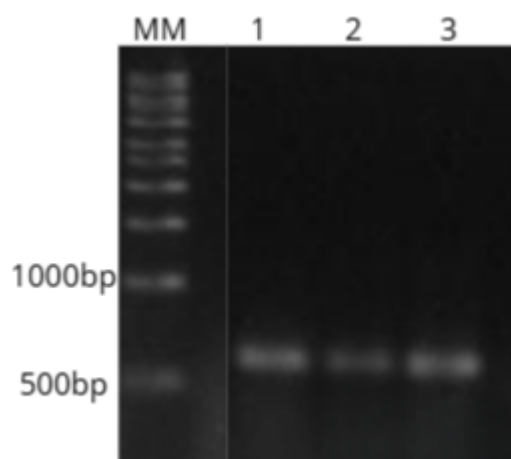


Figura.16 Gel de eletroforese da PCR do gene 503. As linhas 1,2 e 3 são triplicatas da amplificação do gene *traha503197*, e possuem tamanho de 615bp. A linha MM indica o marcador molecular.

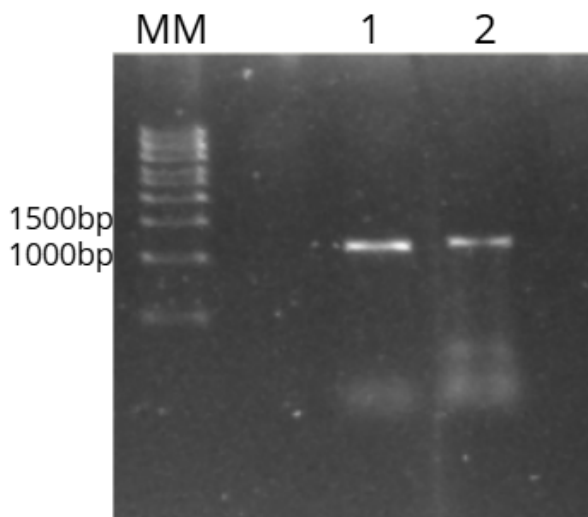


Figura.17. Gel de eletroforese da PCR do gene triha131. As linhas 1 e 2 apresentam uma duplicata do produto de PCR do gene de interesse, o qual apresenta o tamanho de 1073pb. A linha MM apresenta o marcador molecular.

Gene	Conteúdo GC (%)
<i>triha448374</i>	55%
<i>triha63047</i>	59%
<i>triha77405</i>	58%
<i>triha131108</i>	58%
<i>triha503197</i>	60%
<i>triha99387</i>	56%

Tabela 4. Conteúdo GC para cada um dos genes de LPMO em estudo.

A clonagem dos amplicons em pGEM®-T Easy foi confirmada com sucesso pela digestão dupla com NotI/EcoRI para o gene 503 (Figura.18) e para o gene 131 (Figura.19). As digestões tiveram o inserto eluído com sucesso para o gene 131 (Figura.20). A dificuldade no

processo de eluição da banda de DNA correspondente ao gene 503 se deu pela baixa eficiência na digestão do plasmídeo com as enzimas NotI/EcoRI, causando a liberação do inserto em baixas concentrações.

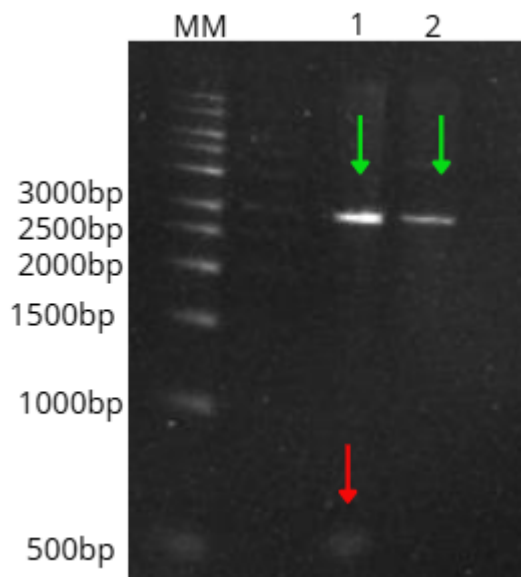


Figura.18. Gel de eletroforese da digestão do vetor pGEM-503 com as enzimas NotI/EcoRI. A linha 1 apresenta o vetor pGEM-503 digerido com as enzimas NotI/EcoRI, ocorrendo a liberação do inserto de 615pb indicada pela seta vermelha, a seta verde indica o plasmídeo vazio com 3000pb. A linha 2 apresenta o controle negativo, com o plasmídeo pGEM®-T Easy que não contém o inserto.

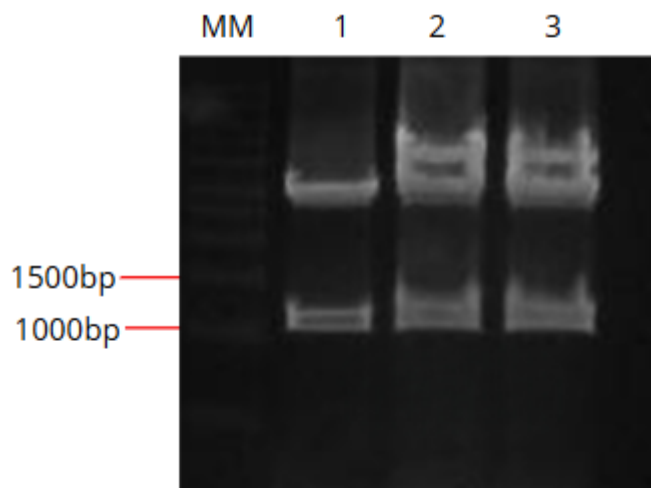


Figura.19. Gel de eletroforese do vetor pGEM-131 digerido com as enzimas NotI/EcoRI. É possível visualizar a liberação do inserto de 1073bp. O vetor vazio aparece no tamanho de 3000bp

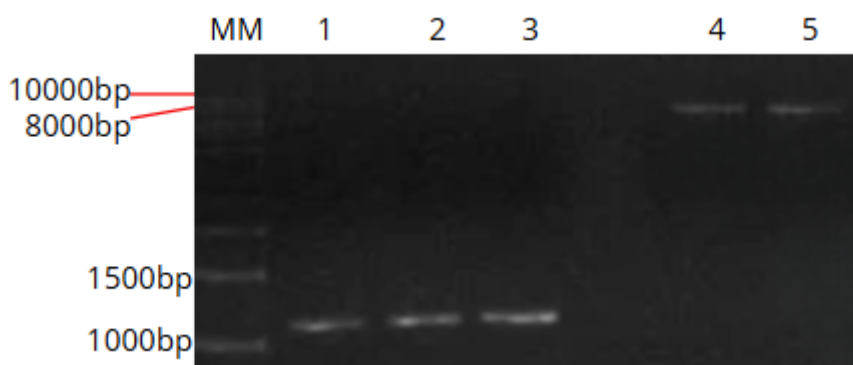


Figura.20. Gel de eletroforese da eluição das bandas do inserto obtido na digestão do vetor pGEM-131. As bandas de tamanho 8024bp representam o plasmídeo PPIC9 digerido e eluído, ao passo que as bandas de 1073bp indicam o inserto que foi eluído.

A inserção dos insertos 503 e 131 no vetor pGEM®-T Easy e posterior transformação e plaqueamento de células XL-10-GOLD em meio LB-ampicilina apresentou eficiências de transformação distintas para cada um dos genes em questão. A placa de cultivo de XL-10-GOLD-pGEM-503 apresentou o crescimento de muitas colônias, ao passo que a placa de XL-10-GOLD-pGEM-131 apresentou o crescimento de apenas 2 colônias. Esse fato pode ter se dado pela dificuldade de ligação do gene 131 ao vetor por apresentar maior tamanho em comparação ao gene 503. Outro possível motivo para tamanha diferença na eficiência da transformação pode se dar pela diminuição da eficiência das células competentes congeladas ao longo do tempo, uma vez que a clonagem do gene 503 foi a primeira a ser bem sucedida.

A ligação do gene *trih131108* ao vetor PPIC9 após eluição do inserto de interesse foi bem sucedida. A correta ligação do inserto foi confirmada pela linearização do plasmídeo com a enzima SacI, evidenciando uma banda de 9052bp, correspondente ao tamanho do plasmídeo PPIC9 mais o gene de interesse (Figura.21). Devido às baixas concentrações da banda eluída do gene *trih503197*, não foi possível realizar a sua ligação ao vetor PPIC9. Esse gene foi então sintetizado quimicamente no vetor PPIC9 para expressão em levedura.

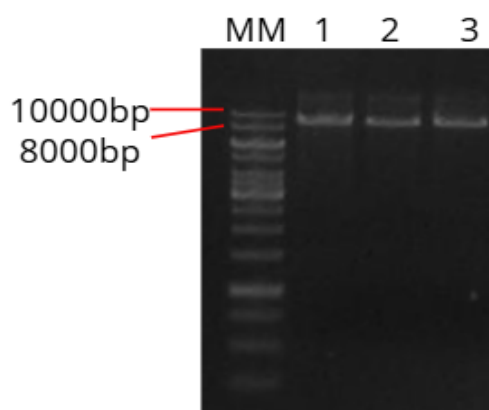


Figura.21 Gel de eletroforese da linearização do plasmídeo PPIC9-131 com a enzima SacI. A banda obtida corresponde ao tamanho de 9052bp, a qual corresponde ao tamanho do plasmídeo PPIC9 mais o gene *trih131108*.

O procedimento de eletroporação da linhagem GS115 com o plasmídeo PPIC9-LPMO131 foi bem sucedido, resultando no crescimento de múltiplas colônias da levedura em meio MD sem histidina. O resultado da PCR de colônia evidenciou a amplificação de um fragmento de 1522 bp, correspondendo ao tamanho do fragmento AOX1 mais o gene de interesse (Figura.22).

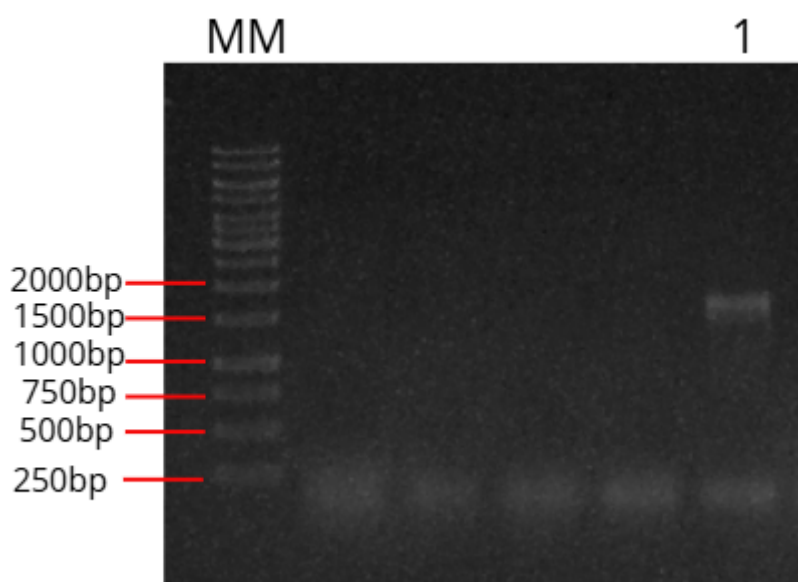


Figura.22. Gel de eletroforese da PCR de colônia de GS115-PPIC9-LPMO131. O poço 1 apresenta o produto de amplificação de um clone positivo no tamanho de 1522bp, correspondendo ao tamanho do gene mais o fragmento de interesse.

4.7 Clonagem do gene *trihA* 503197 sintetizado quimicamente

A transformação de bactérias da linhagem XL-10-GOLD com o plasmídeo PPIC9-503 por meio de choque térmico foi bem sucedida, gerando o crescimento de múltiplas colônias em meio LB com ampicilina. A confirmação da presença do gene no meio intracelular das bactérias foi realizada por PCR de colônia, utilizando-se os primers flanqueadores da região AOX, assim como os primers que flanqueiam a sequência completa do gene, gerando amplicons de 1139 pb e 615 pb, respectivamente (Figura.23).

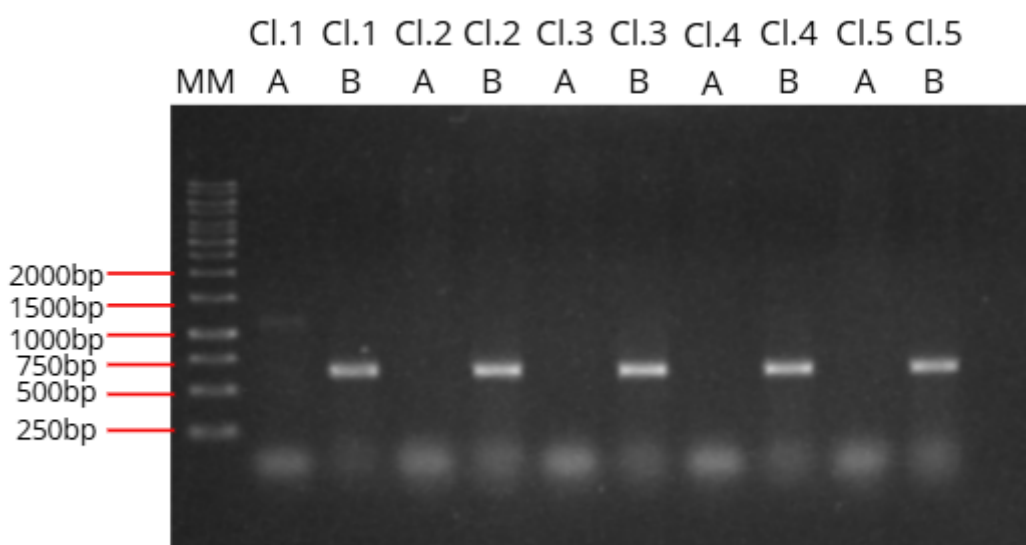


Figura.23. Gel de eletroforese da PCR de 5 colônias de XL-10-GOLD transformadas com o plasmídeo PPIC9-503. Os poços do gel de eletroforese apresentam diferentes clones crescidos em meio LB sólido com ampicilina. Tais clones foram testados para dois diferentes pares de primers, primers que amplificam a região AOX (A), e primers que amplificam o gene de interesse completo (B). Todos os clones testados apresentaram amplificação de um fragmento de 615pb correspondente ao gene completo *trihA503197*. Por outro lado, somente o clone 1 apresentou fragmentação do fragmento AOX de tamanho 1139pb. MM indica o marcador molecular.

Das colônias testadas, somente a primeira amplificou o fragmento AOX em quantidades detectáveis no gel, no entanto, outras 4 colônias testaram positivo para presença do gene de interesse utilizando os primers para amplificação do gene completo. Esse resultado pode ser explicado pela dificuldade de amplificação de um fragmento de mais de 1000pb utilizando-se a técnica de PCR de colônia.

Para a linearização do vetor visando a integração do plasmídeo PPIC9-503 no genoma da levedura, utilizou-se a enzima *SacI*. O gel de eletroforese confirmou a completa digestão do plasmídeo em tamanho correto de 8668 pb (Figura.24).

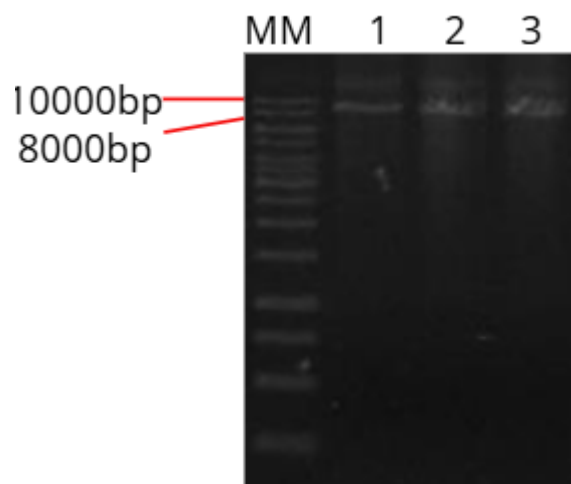


Figura.24. Gel de eletroforese da digestão do plasmídeo PPIC9-503 com a enzima *SacI*. As linhas 1,2 e 3 apresentam o material plasmidial digerido de tamanho 8998bp. MM indica o marcador molecular.

O procedimento de eletroporação da linhagem GS115 com o plasmídeo PPIC9-503 foi realizado com sucesso, obtendo-se várias colônias na placa de MD sem histidina em um método de seleção auxotrófico. A confirmação da presença do gene no genoma da levedura após recombinação homóloga foi realizada por PCR de colônia para leveduras com os primers AOX, sendo possível observar o fragmento de tamanho 1139 pb esperado em 3 colônias diferentes (Figura.25)

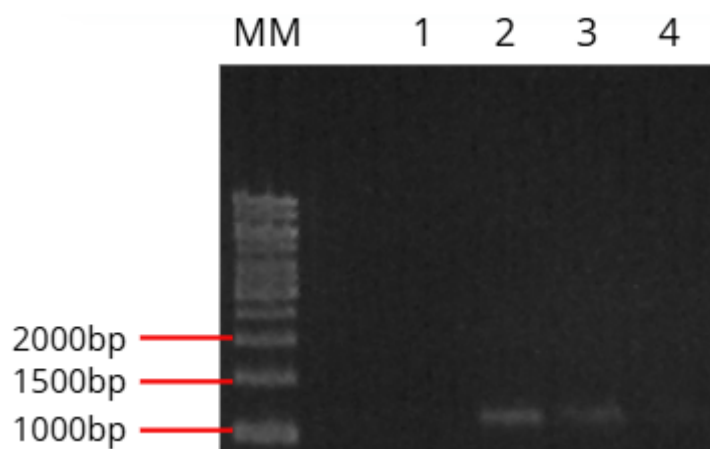


Figura.25. Gel de eletroforese da PCR de 4 colônias de GS115 transformadas com o plasmídeo PPIC9-503. As linhas 1,2,3 e 4 apresentam a amplificação do fragmento AOX de diferentes clones. Somente os clones das linhas 2 e 3 apresentaram amplificação clara no tamanho de 1139bp.

4.8 Expressão da proteína LPMO 131

O perfil de expressão da proteína recombinante foi analisado por 96 horas em meio mínimo e meio BMMY (Figura.25). A massa molecular teórica da proteína heteróloga é de 38.8 KDa. No perfil de expressão, foi possível verificar a presença de uma banda de alta expressão com massa molecular entre 35 e 40 KDa na indução em meio BMMY por 48 horas. É possível verificar duas fortes bandas com alta massa molecular na indução em BMMY por 96 horas, o que pode ser um indicativo de formas hiperglicosiladas da proteína de interesse. A indução em meio mínimo não resultou em bandas de secreção proteica de grande intensidade, o que pode ser o resultado de um crescimento celular mais contido nesse tipo de meio com baixa suplementação de nutrientes (Figura.26A). O mesmo gel foi corado com prata para revelação de bandas de proteínas com expressão mais discreta no sobrenadante (Figura.26B). Adicionalmente, foi realizado um crescimento do clone GS115-PPIC9-LPMO131 em meio BMMY por 48 horas para comparação do secretoma dessa levedura com um clone negativo, no qual não foi possível amplificar a região AOX mais o gene de interesse por PCR de colônia (Figura.27). Esse segundo experimento resultou em uma expressão da proteína de interesse de forma mais intensa, ao passo que a expressão de outras proteínas foram diminuídas.

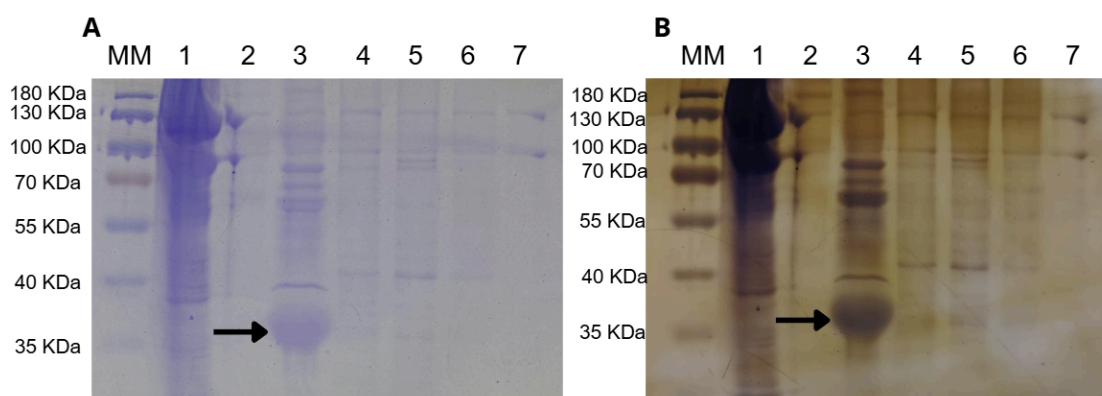


Figura.26 Gel SDS-PAGE corado com comassie-blue (A) e nitrato de prata (B) do sobrenadante do clone *K.phaffi*-PPIC9-LPMO131 induzido por 96 horas em meio mínimo (MM) e meio tamponado contendo extrato de levedura e metanol (BMMY). As setas indicam a proteína de interesse no tamanho de 38,8 kDa. As linhas 1,2 e 3 indicam o sobrenadante da levedura crescida em meio BMMY por 96, 72 e 48 horas, respectivamente. As linhas 4,5,6 e 7 indicam o sobrenadante do cultivo em MM crescido por 96,72,48 e 24 horas, respectivamente.

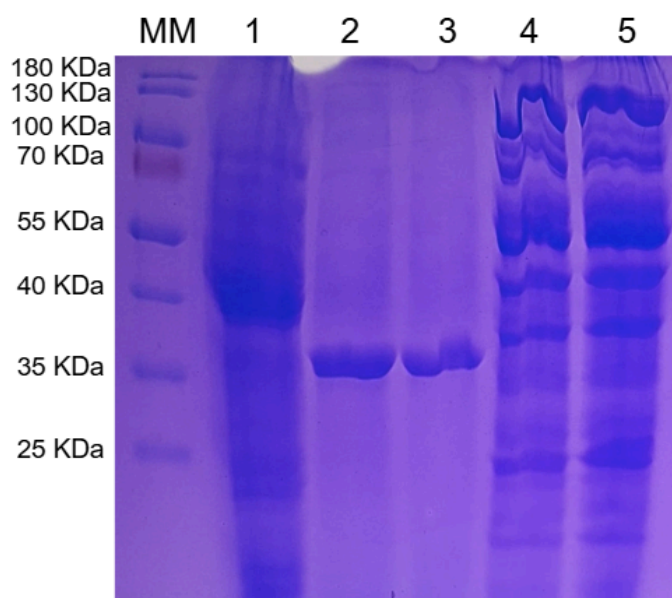


Figura.27. Gel SDS-PAGE do sobrenadante do clone GS115-PPIC9-LPMO131 e controles negativos. A linha 1 apresenta um clone negativo, o qual não apresenta a amplificação da região AOX por PCR de colônia. As linhas 2 e 3 apresentam o sobrenadante do clone positivo, evidenciando a proteína heteróloga de tamanho 38,8 KDa. As linhas 4 e 5 apresentam o sobrenadante da levedura transformada com o vetor PPIC9 vazio.

4.9 Identificação da LPMO 131 por espectrometria de massas (MALDI/TOF)

A identificação por espectrometria de massas resultou em um espectro com picos de boa intensidade para relações massa/carga (m/z) mais baixas (Figura.28). Foram identificados picos em 760.43, 814.487, 890.387, 915.450, 987.506, 1063.447, 1255.470, 1504.625, 1603.739, 1822.682, 2240.951, 2540.199, 3137.372, 3391.417. A identificação da proteína no banco de dados MASCOT resultou em uma proteína não relacionada ao fungo *T.Harzianum* ou a levedura *K.phaffii*, o que pode denotar baixa qualidade do experimento, que pode estar relacionada a dificuldade na tripsinização da proteína, ou ainda descalibração no equipamento utilizado.

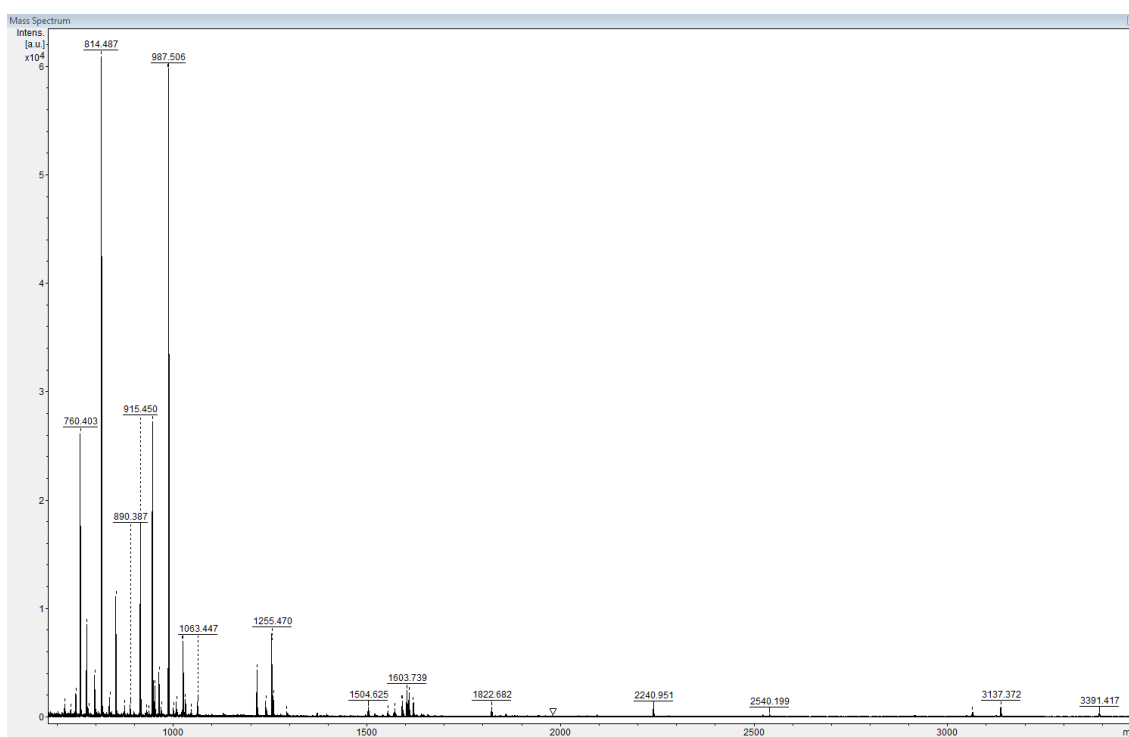


Figura.28. Espectro de massa da proteína LPMO 131. Foram identificados picos em 760.43, 814.487, 890.387, 915.450, 987.506, 1063.447, 1255.470, 1504.625, 1603.739, 1822.682, 2240.951, 2540.199, 3137.372, 3391.417.

4.10 Expressão da proteína LPMO 503 em GS115

A expressão da proteína de interesse LPMO 503 foi avaliada em coleta de ponto único, em uma indução em BMMY por 72 horas (Figura.29). Foi possível observar a presença de uma banda de expressão intensa na altura de 25 KDa, semelhante à massa molecular teórica dessa proteína de 23,64 KDa. O poço contendo o sobrenadante de um clone negativo para a presença do gene após o promotor AOX não possui uma banda de tamanho correspondente.

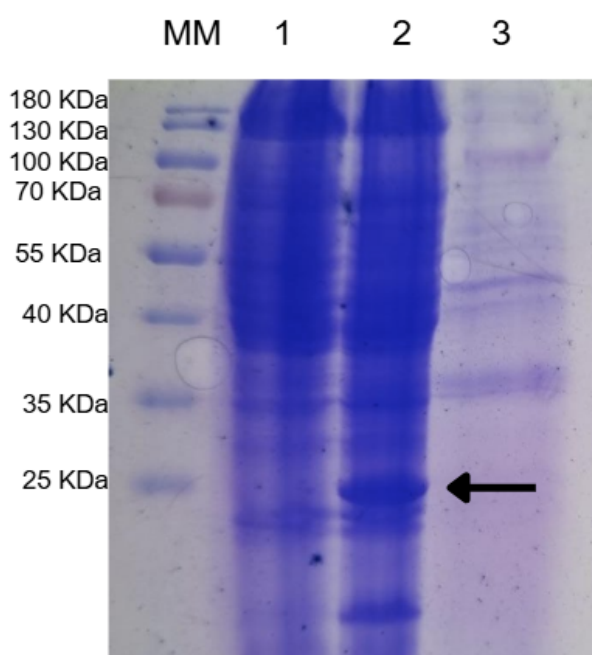


Figura.29. Gel SDS-PAGE do sobrenadante do clone GS115-PPIC9-LPMO503 e controles negativos. A linha 1 apresenta um clone negativo, o qual não apresenta a amplificação da região AOX por PCR de colônia. A linha 2 apresenta o sobrenadante do clone positivo, é possível verificar uma banda de expressão de altura aproximada de 23,64 Kda. A linha 3 indica o sobrenadante da levedura transformada com o vetor PPIC9 sem o gene de interesse.

4.11 Clonagem do gene *trih503197* em BL21(DE3)

A transformação do vetor pET28a-LPMO503 foi bem sucedida e confirmada por digestão dupla do plasmídeo com as enzimas NotI/EcoRI (Figura.30). Foi possível constatar na linha 1 do gel de eletroforese a liberação do inserto de tamanho 615bp (indicado pela seta vermelha), além de uma banda correspondente ao plasmídeo vazio de 5369bp. Na linha 2, é

possível constatar uma banda única após a digestão simples do plasmídio contendo o gene de interesse com a enzima NotI, de tamanho aproximado de 5984bp.

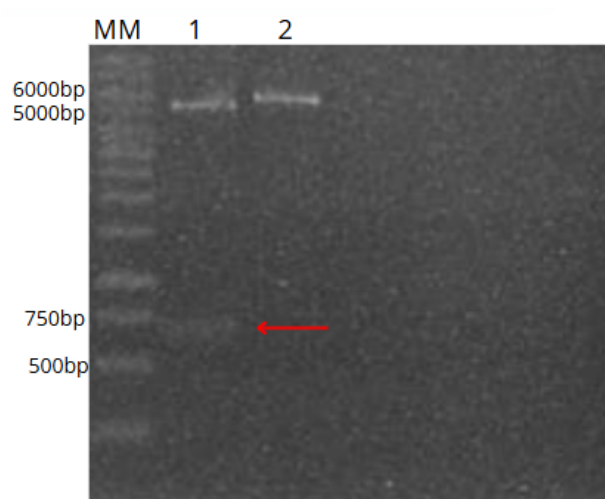


Figura.30. Gel de eletroforese da digestão dupla do vetor pET28a-LPMO503 pelas enzimas NotI/EcoRI. A linha 1 apresenta a digestão do plasmídio contendo o gene de interesse, sendo possível observar a liberação do inserto de 615bp. A linha 2 apresenta o mesmo plasmídio digerido unicamente com a enzima NotI para comparação de tamanho. A linha MM apresenta o marcador molecular.

4.12 Expressão do gene *trih503197* em BL21(DE3)

A expressão do gene de interesse foi avaliada em 5 diferentes clones BL21(DE3)-pET28a-LPMO503 após indução em meio LB autoindutor em gel SDS-PAGE (Figura.31). As linhas 1 até a 5 apresentam a fração solúvel obtida de cada um dos clones após sonicação. Foi possível observar a forte expressão de uma banda de tamanho aproximado de 25 KDa, semelhante ao tamanho esperado de 23,64 KDa da proteína de interesse.

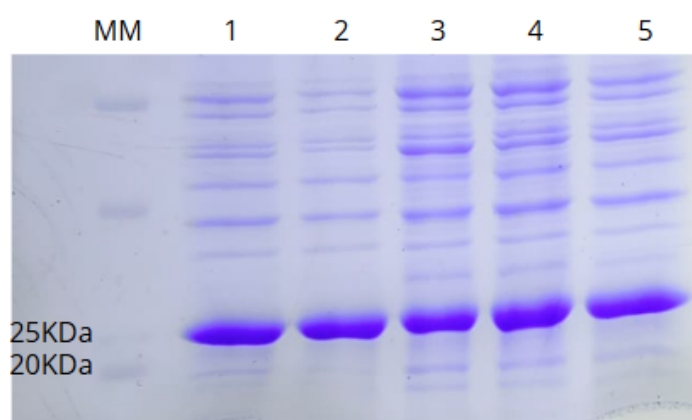


Figura.31. Gel SDS-PAGE da fração solúvel de 5 clones BL21(DE3)-pET28a-LPMO503. As linhas 1 a 5 apresentam os sobrenadantes dos diferentes clones induzidos em meio autoindutor. A linha MM apresenta o marcador de peso molecular. É possível verificar uma banda de expressão de altura aproximada de 23,64 Kda em todas as amostras.

Para realizar a purificação da proteína de interesse, procedeu-se à passagem do material em coluna de níquel, resultando em um cromatograma com aumento do pico de absorvância entre as frações 30 e 47. As frações coletadas foram utilizadas como amostra de um gel SDS-PAGE (Figura.32). As linhas 1 a 4 apresentam frações coletadas antes do início do gradiente de imidazol, apresentando um grande número de proteínas intracelulares de *E.coli* não ligantes à coluna cromatográfica. As linhas 7 e 8 apresentaram uma purificação parcial, com uma banda correspondente ao tamanho aproximado de 25KDa (indicada pela seta vermelha). Por outro lado, as linhas 9 e 10 evidenciaram uma banda menor de tamanho entre 20 e 25 KDa (indicada pela seta azul). Por fim, as linhas 12 até 16 mostraram bandas de tamanho superior a 25 KDa (seta verde). Esses resultados indicam uma purificação parcial da proteína de interesse. As linhas 9 e 10 apresentam banda de tamanho mais aproximado ao esperado para a proteína heteróloga, dessa forma, essas frações foram priorizadas para realização de teste de western blot.

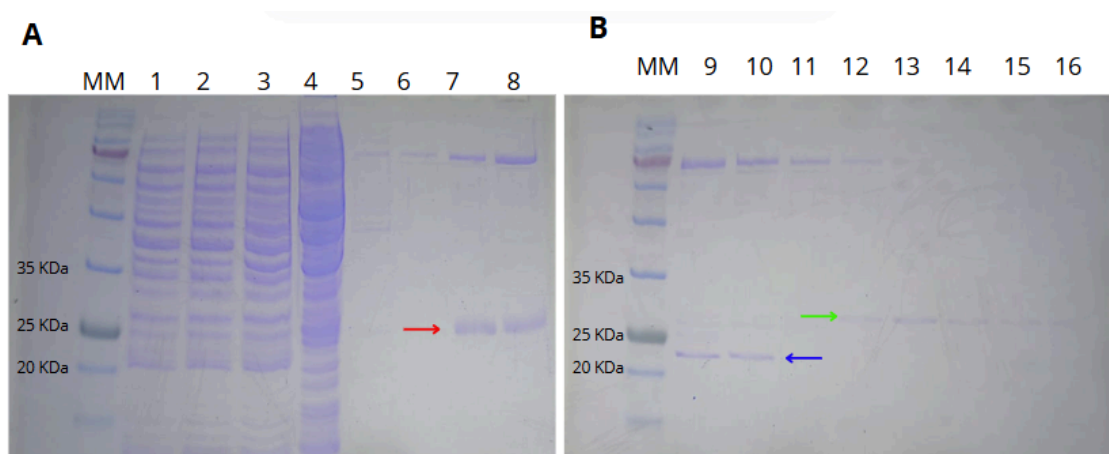


Figura.32. Gel SDS-PAGE das frações purificadas por cromatografia de afinidade. As linhas 1 até 4 apresentam as frações que não se ligaram à coluna de níquel. As linhas 5 até a 16 apresentam as frações eluídas da coluna com o aumento do gradiente de imidazol (frações 25,27,29,31,33,35,37,39,41,43,47 no cromatograma).

4.13 Western blot LPMO 503

Para confirmação da identidade da proteína LPMO 503, procedeu-se a um western blot utilizando anticorpo anti-His tag. Foi possível verificar a presença de bandas bem definidas em altura semelhante à esperada para a proteína de interesse (Figura.33). As linhas A até a E indicam diferentes clones de BL21(DE3)-pET-28a-LPMO503. Somente nos clones A e D foram detectadas bandas de proteínas por imunodeteção em tamanho aproximado de 25 KDa. A pequena diferença entre o tamanho real da proteína de 23,64 KDa e a banda observada com massa um pouco superior ao esperado, pode ter ocorrido pela diferença de corrida entre o gel utilizado como espelho e aquele utilizado para o western blot.

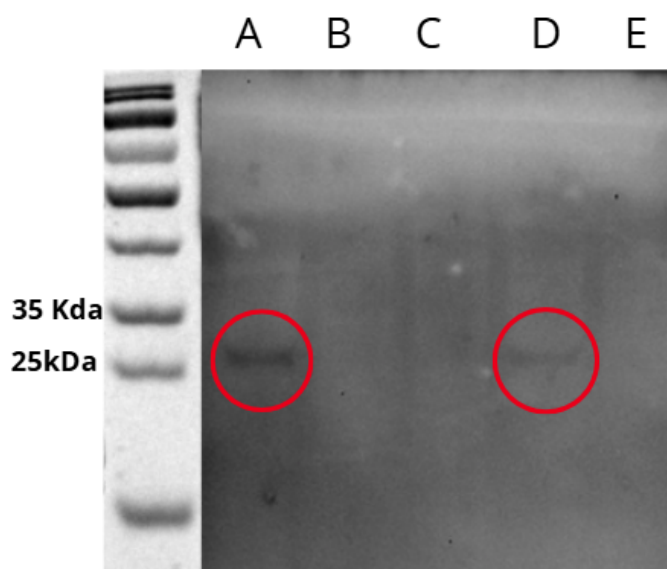


Figura.33. Western blot da fração solúvel de 5 clones BL21(DE3)-pET28a-LPMO503. As linhas A e D apresentaram banda visível para imunodeteção com anticorpo anti His-Tag de tamanho aproximado a 25 KDa.

4.14 Análise da expressão dos genes de LPMO de *Trichoderma Harzianum* por qPCR

4.13.1 Análise dos genes de referência actina (act), a-tubulina (a-tub), e fator de alongação (EF)

Para verificar a qualidade dos genes de referência escolhidos, utilizou-se os parâmetros M e CV, avaliados por meio dos parâmetros computacionais do Software Genorm, contido no programa de análise de dados qBase+. Esses parâmetros dizem respeito à estabilidade do gene. O valor M pode ser calculado levando-se em conta o número de amostras (n) em diferentes condições experimentais (braquiária, bagaço-de-cana e glicose para 2,4,6 e 8 dias), assim como as diferenças nas expressões relativas entre os genes de referência utilizados (act, a-tub, EF). A fórmula para o cálculo de M é mostrada na (Figura.34). Por sua vez, o cálculo de CV (coeficiente de variação) é uma medida de dispersão relativa da expressão do gene de referência em relação à média. A fórmula para o cálculo de CV é mostrada na (Figura.35).

$$M_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n |\Delta C_{Tij} - \Delta C_{Tkj}|$$

Figura.34. Fórmula para o cálculo de M pelo software Genorm. M_i é o valor da estabilidade do gene, n é o número de condições experimentais, ΔC_{Tij} e ΔC_{Tkj} são as diferenças nas expressões relativas entre os genes de referência i e k na amostra j.

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \times 100$$

Figura.35. Fórmula para o cálculo de CV pelo software Genorm. σ é o desvio padrão das expressões relativas do gene de referência. μ é a média das expressões relativas do gene de referência.

O cálculo dos parâmetros M e CV foram realizados integrando os resultados dos 3 genes de referência, assim como somente os dados de act e a-tub (Figura.36). Como o conjunto de genes act e a-tub apresentaram valores abaixo de 1, esses foram utilizados para o cálculo de expressão relativa dos 6 genes de LPMOs de interesse. Foi possível constatar que a

expressão do gene EF não apresenta estabilidade adequada para as condições experimentais apresentadas avaliadas nesse trabalho, de tal forma que a integração dos resultados de expressão desse gene de referência aumenta os valores de M e CV. Dados da literatura avaliaram o valor da estabilidade de 10 genes candidatos por meio do valor M do software Genorm, entre eles o gene act1 ⁶⁴. Nesse estudo, o fungo *Trichoderma atroviride* foi submetido a crescimento em meio batata/dextrose-ágar (PDA) em ciclos de claro e escuro por 72 horas para determinar a estabilidade dos genes nessas diferentes condições ambientais. Foi possível observar que o gene act1 apresentou valor M igual a 0,349, ficando atrás de outros genes, tais como *tbp* (M=0,042) e *rho* (M=0,042). É importante salientar, no entanto, que o crescimento do fungo em substratos complexos tais como a braquiária e o bagaço-de-cana dificulta a estabilidade dos genes de referência ao longo do tempo. De maneira geral, fungos filamentosos crescidos em substratos como glicose e xilose, apresentaram genes de referência com maior estabilidade em comparação a outros substratos mais complexos, como palha-de-trigo e farelo-de-trigo ⁶⁵. Dessa maneira, a obtenção de valores de M abaixo de 1 são aceitáveis nas condições experimentais utilizadas nos experimentos.

Reference Target	M	CV
Act	0,975	0,285
a-tub	0,975	0,404
Average	0,975	0,344

Reference Target	M	CV
Act	3,864	0,8
EF	4,396	0,981
a-tub	4,882	1,212
Average	4,361	0,998

Reference Target	M	CV
Act	6,949	3,140
EF	6,949	1,533
Average	6,949	2,336

Figura.36. Resultados de M e CV para dois conjuntos de genes de referência distintos. Ao considerar os valores obtidos do gene EF, os parâmetros de qualidade distanciam-se do valor ideal.

4.14.2 Análise da expressão relativa de LPMOs

A análise de expressão dos genes *triha448374*, *triha99187* foi realizada de forma a obter a expressão relativa desses genes em relação ao controle de glicose, o qual é considerado como fonte de carbono inibitória da expressão de enzimas ativas sobre carboidrato. O crescimento do fungo em braquiária por 2 dias resultou em uma expressão aproximadamente 10 vezes maior do gene *Triha448374* que o controle. Houve queda de expressão para o crescimento por 4 dias, resultando em uma expressão 5 vezes maior que o controle de glicose. A expressão volta a aumentar no quarto dia, alcançando uma superexpressão de aproximadamente 10 vezes. Por fim, no oitavo dia, a expressão aumenta até cerca de 100 vezes mais que o controle de glicose (Figura.37). Em bagaço-de-cana, esse mesmo gene apresenta uma grande superexpressão, com valores que superam 1000 vezes a expressão do controle, com destaque para o crescimento por 4 dias, que alcança valores de superexpressão próximos a 4000 vezes (Figura.38).

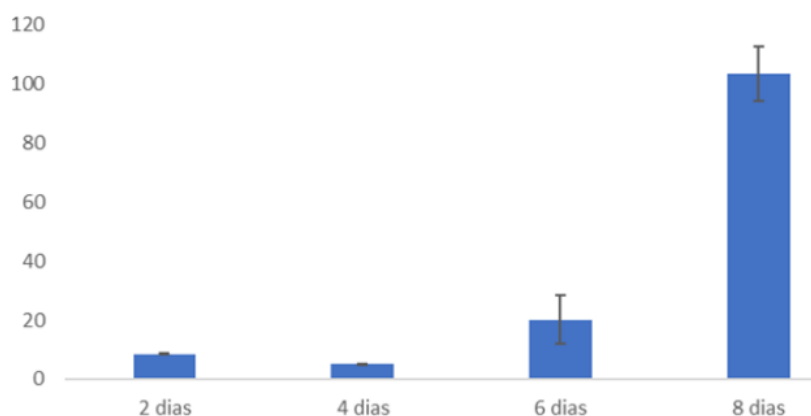


Figura.37. Expressão relativa do gene LPMO *triha448374* crescido em meio mínimo com braquiária (1%) por 8 dias utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O eixo y representa numericamente o aumento de expressão com relação ao controle crescido em glicose.

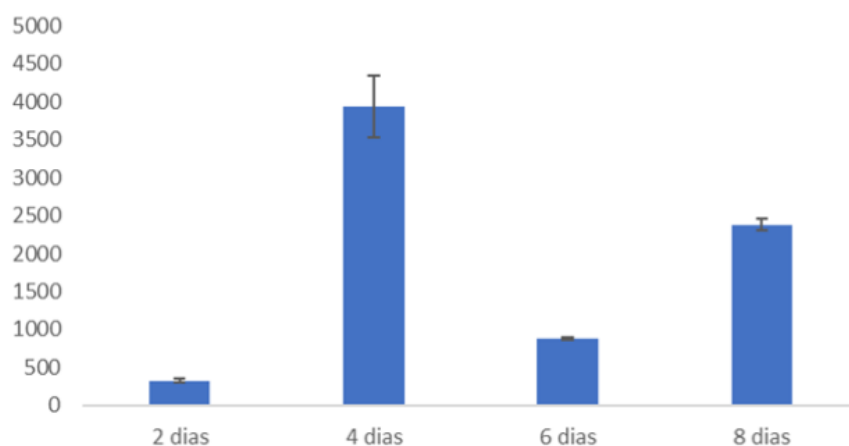


Figura.38 Expressão relativa do gene LPMO *triha448374* crescido em meio mínimo com bagaço-de-cana (1%) por 8 dias utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O eixo y representa numericamente o aumento de expressão com relação ao controle crescido em glicose.

Por outro lado, a expressão do gene *triha99387* diante do crescimento em braquiária é aumentada discretamente nos dias 2,4 e 6, com expressão máxima de 9 vezes no dia 4. No entanto, ao oitavo dia a expressão aumenta fortemente, alcançando valores de superexpressão próximos a 200 vezes (Figura.39). Esse mesmo gene apresenta expressão mais forte em bagaço-de-cana. No dia 2, ocorreu uma superexpressão de aproximadamente 300 vezes, no dia 4 essa expressão diminuiu, atingindo valores próximos a 220 vezes. Nos dias 6 e 8 ocorre aumento gradativo da expressão, com superexpressão próximas a 1600 vezes no dia 6 e próxima a 1900 vezes no dia 8 (Figura.40). Esses dados corroboram com a dificuldade da obtenção de açúcares simples e assimiláveis metabolicamente em substratos complexos como o bagaço-de-cana, sendo necessário a expressão massiva de enzimas ativas sobre carboidrato, tais como as LPMOs. Os estudos já publicados demonstraram grandes aumentos da expressão de LPMOs em bagaço-de-cana. Em *A.fumigatus*, houve um aumento de expressão de aproximadamente 600 vezes para a LPMO AA9 do gene *Afu3g03870*, e 430 vezes para a LPMO AA9 do gene *Afu4g07850* quando esse fungo foi crescido em bagaço-de-cana pela metodologia de RNAseq. Para testar a expressão do gene *Afu3g03870* ao longo do tempo quando crescido em bagaço-de-cana, os pesquisadores também realizaram a análise de expressão relativa por qPCR, tendo obtido o maior incremento de expressão em 12 e 18 horas, em um período total analisado de 24 horas⁶⁶.



Figura.39. Expressão relativa do gene LPMO *triha99387* crescido em meio mínimo com braquiária (1%) por 8 dias utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O eixo y representa numericamente o aumento de expressão com relação ao controle crescido em glicose.

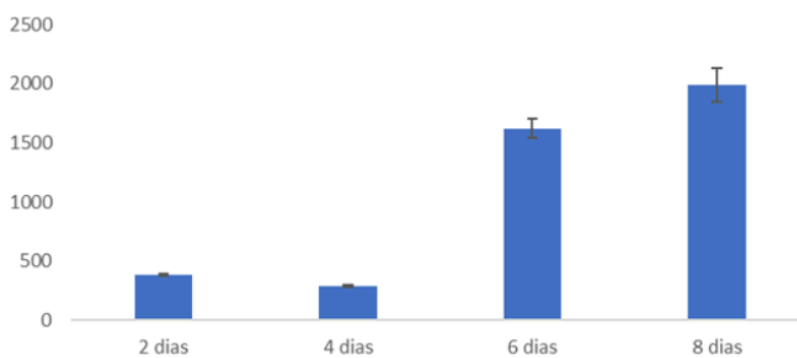


Figura.40. Expressão relativa do gene LPMO *triha99387* crescido em meio mínimo com bagaço-de-cana (1%) por 8 dias utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O eixo y representa numericamente o aumento de expressão com relação ao controle crescido em glicose.

5 CONCLUSÃO

As LPMOs são enzimas de atividade auxiliar que desempenharam um papel fundamental na adaptação de microrganismos ao ambiente rico em oxigênio que lhes foi apresentado ao longo do processo evolutivo, e possuem grande potencial para aplicação industrial. O fungo *T.harzianum* codifica 6 diferentes LPMOs, e seu grande potencial na hidrólise de diferentes substratos leva a crer que essas proteínas possuem grande eficiência no auxílio a degradação de substratos insolúveis. A expressão heteróloga dessas enzimas constitui um importante recurso para obtenção de quantidades apreciáveis dessas moléculas, sendo a levedura *K.phaffii* e a bactéria *E.coli* importantes chassis de expressão.

A análise estrutural e alinhamento das sequências polipeptídicas dessas proteínas evidencia a grande conservação do ‘histidine brace’ em todos os representantes dessa classe de enzimas, assim como o terceiro resíduo de tirosina que coordena a ligação do cobre ao sítio ativo nas enzimas AA9. A construção de uma grande árvore filogenética foi capaz de isolar as diferentes regioselectividades, tendo as LPMOs 488 e 993 sido classificadas como C1/C4 e a LPMO 131 como C1 restrita. As LPMOs AA11 ainda precisam de mais caracterizações para permitir uma melhor classificação de regioselectividade com base em sequências polipeptídicas.

A expressão heteróloga dessas enzimas apresenta desafios devido ao alto conteúdo de guaninas em citocinas nas sequências gênicas codificadoras das LPMOs. O presente trabalho obteve sucesso na clonagem dos genes de interesse nos plasmídeos pGEM®-T Easy, PPIC9 e pET-28a.

A expressão dos genes de interesse apresentaram diferentes eficiências em *K.phaffii*. O clone GS115-PPIC9-LPMO131 apresentou possível expressão da proteína em tamanho semelhante ao esperado, no entanto, não foi possível realizar a confirmação da presença da proteína em gel SDS-PAGE por espectrometria de massas. Obteve-se um resultado semelhante com a expressão do clone GS115-PPIC9-LPMO503. Por outro lado, a expressão do clone BL21(DE3)-pET-28a-LPMO503 foi bem sucedida, tendo sido purificada parcialmente por cromatografia de afinidade e confirmada por western blot.

A análise de expressão relativa dos genes de LPMOs de *T.harzianum* cultivado em bagaço de cana e braquiária apresentou diferentes graus de expressão. Notável superexpressão foi observada em bagaço de cana para os dois genes analisados, superando em mais de 2000 vezes a expressão em glicose. Esses achados apontam para o desprendimento de esforços metabólicos por parte do microrganismo para maximizar a expressão de enzimas ativas sobre

carboidrato em condições ambientais específicas, evidenciando a importância dessa moléculas para a evolução e o desenvolvimento da espécie *T.harzianum*.

Novos estudos são necessários para caracterizar as LPMOs 131 e 503, assim como confirmar suas regioseletividades por estudos de espectrometria. Ensaio de sinergismo serão capazes de analisar a aplicação industrial dessas enzimas, principalmente em se tratando de aplicações na produção de biocombustíveis e controle biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Enzymes Market Size And Share _ Industry Report, 2030. [sem data].
2. Zoghalmi A, Paës G. Lignocellulosic biomass: understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. *Front Chem.* 2019;7:874. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>
3. Guo M, Song W, Buhain J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renew Sust Energ Rev.* 2015;42:712–25.
4. Oak Ridge National Laboratory. Bioenergy conversion factors. Oak Ridge, TN: ORNL; 2013.
5. Statistical Review of World Energy, 2024.
6. Global Energy Review 2025.
7. Global Witness. The supermajors' plans could kill 115 million people. <https://globalwitness.org/en/campaigns/fossil-fuels/the-supermajors-plans-could-kill-115-million-people/>
8. 2023 Global Carbon Budget report.
9. Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study.
10. Tsegaye KN, Alemnew M, Berhane N. *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic ethanol production: a look at key attributes and genome shuffling. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024;12:1466644. doi: 10.3389/fbioe.2024.1466644
11. Basak B, Kumar R, Bharadwaj AVSLS, Kim TH, Kim JR, Jang M, et al. Advances in physicochemical pretreatment strategies for lignocellulose biomass and their effectiveness in bioconversion for biofuel production. *Bioresour Technol.* 2023;369:128413. doi: 10.1016/j.biortech.2022.128413
12. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries.
13. IEA Bioenergy. Ren21 Global Status Report. 2023.
14. Nath S, Kango N. Recent Developments in Industrial Mycozymes: A Current Appraisal. *Mycology.* 2021 Sep 16;13(2):81-105.
15. Kubicek CP, Steindorff AS, Chenthamara K, Manganiello G, Henrissat B, Zhang J, Cai F, Kopchinskiy AG, Kubicek EM, Kuo A, Baroncelli R, Sarrocco S, Noronha EF, Vannacci

- G, Shen Q, Grigoriev IV, Druzhinina IS. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics*. 2019 Jun 12;20(1):485.
16. Ferreira Filho JA, et al. Carbohydrate-active enzymes in *Trichoderma harzianum*: A bioinformatic analysis bioprospecting for key enzymes for the biofuels industry. *BMC Genomics*. 2017;18(1).
 17. Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 1995;3:853–9. PMID: 8535779
 18. Schuman B, Evans SV, Fyles TM. Geometric attributes of retaining glycosyltransferase enzymes favor an orthogonal mechanism. *PLoS One*. 2013;8(8):e71077. doi: 10.1371/journal.pone.0071077
 19. Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:521–55. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322
 20. Yu H, Takeuchi M, LeBarron J, et al. Notch-modifying xylosyltransferase structures support an S_Ni-like retaining mechanism. *Nat Chem Biol*. 2015;11:847–54. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1927>
 21. Lombard V, Bernard T, Rancurel C, Brumer H, Coutinho PM, Henrissat B. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochem J*. 2010;432(3):437–44. doi: 10.1042/BJ20101185
 22. Li Q, Zheng L, Guo Z, Tang T, Zhu B. Alginate degrading enzymes: an updated comprehensive review of the structure, catalytic mechanism, modification method and applications of alginate lyases. *Crit Rev Biotechnol*. 2021;41(6):953–68. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1898330>
 23. Armendáriz-Ruiz M, Rodríguez-González JA, Camacho-Ruiz RM, Mateos-Díaz JC. Carbohydrate Esterases: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2018;1835:39–68. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_2
 24. Suzuki K, Suzuki M, Taiyoji M, Nikaidou N, Watanabe T. Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998 Jan;62(1):128-35.
 25. Vaaje-Kolstad G, et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*. 2010;330:219–22.
 26. Calderaro F, Bevers LE, van den Berg MA. Oxidative power: Tools for assessing lpmo activity on cellulose. *Biomolecules*. 2021;MDPI.

27. Quinlan RJ, et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(37):15079–84.
28. Bissaro B, et al. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nat Chem Biol*. 2017;13(10):1123–8.
29. Westereng B, et al. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. *Sci Rep*. 2015;5.
30. Courtade G, et al. Interactions of a fungal lytic polysaccharide monooxygenase with beta-glucan substrates and cellobiose dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:5922–7.
31. Beeson WT, Vu VV, Span EA, Phillips CM, Marletta MA. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:923–46.
32. Current understanding of substrate specificity and regioselectivity of LPMOs.
33. Zhou X, Qi X, Huang H, Zhu H. Sequence and structural analysis of AA9 and AA10 LPMOs: an insight into the basis of substrate specificity and regioselectivity. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4594
34. Frommhagen M, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9:186.
35. Karbalaie M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*. 2020;1 Sept.
36. Eijssink, V.G.H., Petrovic, D., Forsberg, Z. et al. On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biotechnol Biofuels* 12, 58 (2019).
37. Lutcke H. Signal Recognition Particle (SRP), a Ubiquitous Initiator of Protein Translocation. *Eur J Biochem*. 1995;228(3):531–50.
38. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014.
39. de Gouvêa PF, et al. Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* can Improve Enzymatic Cocktail Activity During Sugarcane Bagasse Hydrolysis. *Protein Pept Lett*. 2019;26(5):377–85.
40. Schirmermeister BE, de Vos JM, Antonelli A, Bagheri HC. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:1791–6.

41. Profile Comparer Extended: phylogeny of lytic polysaccharide monooxygenase families using profile hidden Markov model alignments.
42. Vaaje-Kolstad G, et al. A of recalcitrant polysaccharides. *Science*. 2010;330:219–22.
43. Quinlan RJ, et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:15079–84.
44. Ayuso-Fernández I, et al. Redox robustness drives LPMO evolution. *bioRxiv*. 2025. <https://doi.org/10.1101/2025.06.16.659879>
45. Angeltveit CF, et al. Enhancing enzymatic saccharification yields of cellulose at high solid loadings by combining different LPMO activities. *Biotechnol Biofuels Bioprod*. 2024;17(1):39.
46. Zhou H, et al. A lytic polysaccharide monooxygenase from *Myceliophthora thermophila* and its synergism with cellobiohydrolases in cellulose hydrolysis. *Int J Biol Macromol*. 2019;139:570–6.
47. Bernardi AV, et al. LPMO AfAA9_B and Cellobiohydrolase AfCel6A from *A. fumigatus* Boost Enzymatic Saccharification Activity of Cellulase Cocktail. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):276.
48. Benocci T, et al. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels*. 2017;10:152.
49. Tani S, Kawaguchi T, Kobayashi T. Complex regulation of hydrolytic enzyme genes for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(11):4829–37.
50. Kunitake E, Kobayashi T. Conservation and diversity of the regulators of cellulolytic enzyme genes in Ascomycete fungi. *Curr Genet*. 2017;63(6):951–8.
51. Quinlan RJ, et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:15079–84.
52. Tamayo EN, Villanueva A, Hasper AA, de Graaff LH, Ramón D, Orejas M. A mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*, *Fungal Genetics and Biology*, Volume 45, Issue 6, 2008,
53. Antoniêto AC, et al. *Trichoderma reesei* CRE1-mediated Carbon Catabolite Repression in Response to Sophorose Through RNA Sequencing Analysis. *Curr Genomics*. 2016;17(2):119–31.

54. Ries L, et al. Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*. 2013;14:541.
55. Tölgo M, et al. Genomic and transcriptomic analysis of the thermophilic lignocellulose-degrading fungus *Thielavia terrestris* LPH172. *Biotechnol Biofuels*. 2021;14(1):131.
56. Mello BL, Polikarpov I. Family 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates. *AMB Express*. 2014;4:36.
57. Tamburrini KC, et al. The disordered C-terminal tail of fungal LPMOs from phytopathogens mediates protein dimerization and impacts plant penetration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 121 (13) e2319998121, <https://doi.org/10.1073/pnas.2319998121>
58. Watarai N, et al. Evolution of *Aspergillus oryzae* before and after domestication inferred by large-scale comparative genomic analysis. *DNA Res.* 2019;26(6):465–72.
59. Luo Z, et al. *Myceliophthora thermophila* as promising fungal cell factories for industrial bioproduction: From rational design to industrial applications. *Bioresour Technol.* 2025;419:132051.
60. Borisova AS, et al. Structural and functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase with broad substrate specificity. *J Biol Chem.* 2015;290:22955–69.
61. Danneels B, Tanghe M, Desmet T. Structural Features on the Substrate-Binding Surface of Fungal Lytic Polysaccharide Monooxygenases Determine Their Oxidative Regioselectivity. *Biotechnol J.* 2019
62. Stopamo FG, Rohr AK, Mekasha S, Petrović DM, Várnai A, Eijsink VGH. Characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* shows functional variation among family AA11 fungal LPMOs. *J Biol Chem.* 2021(1).
63. Yang Z, Yang J, Yue L, Shen B, Wang J, Miao Y, Ouyang R, Hu Y. Enhancement Effects and Mechanism Studies of Two Bismuth-Based Materials Assisted by DMSO and Glycerol in GC-Rich PCR. *Molecules.* 2023
64. Flatschacher D, Eschlböck A, Zeilinger S. Identification and evaluation of suitable reference genes for RT-qPCR analyses in *Trichoderma atroviride* under varying light conditions. *Fungal Biol Biotechnol.* 2023;10(1).
65. Llanos A, François JM, Parrou JL. Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. *BMC Genomics.* 2015;16(1).
66. de Gouvêa PF, et al. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. *BMC Genomics.* 2018;19(1):232.