

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ESTUDO CINÉTICO DE
OXIDORREDUTASES ENVOLVIDAS COM A
DESCONSTRUÇÃO DA BIOMASSA**

Bárbara Bonfá Buzzo

Bióloga

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ESTUDO CINÉTICO DE
OXIDOREDUTASES ENVOLVIDAS COM A DESCONSTRUÇÃO
DA BIOMASSA**

Discente: Bárbara Bonfá Buzzo

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutora em Microbiologia
Agropecuária**

2023

B992e	Buzzo, Bárbara Bonfá Expressão heteróloga e estudo cinético de oxidorredutases envolvidas com a desconstrução da biomassa / Bárbara Bonfá Buzzo. -- Jaboticabal, 2024 116 f. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos 1. Biomassa. 2. Enzimas. 3. Bioenergia. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ESTUDO CINÉTICO DE OXIDOREDUCTASES ENVOLVIDAS COM A DESCONSTRUÇÃO DA BIOMASSA

AUTORA: BÁRBARA BONFÁ BUZZO

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente

GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ
Data: 09/01/2024 15:49:15-0300
Verifique em <https://validar.idf.gov.br>

Prof. Dr. GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia / IBILCE UNESP São José do Rio Preto

Prof. Dr. ELWI GUILLERMO MACHADO SIERRA (Participação Virtual)
Universidad Simón Bolívar / Barranquilla/Colômbia

Documento assinado digitalmente

HELEN ALVES PENHA
Data: 16/01/2024 14:05:21-0300
Verifique em <https://validar.idf.gov.br>

Pesquisadora Dra. HELEN ALVES PENHA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Pesquisador Dr. LUIZ ALBERTO COLNAGO (Participação Virtual)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA / São Carlos/SP

Documento assinado digitalmente

LUIZ ALBERTO COLNAGO
Data: 09/01/2024 15:01:52-0300
Verifique em <https://validar.idf.gov.br>

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Bárbara Bonfá Buzzo, nascida em 04 de junho de 1995 na cidade de Morro Agudo, São Paulo. Iniciou sua graduação em fevereiro de 2013 no curso de Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, na cidade de Jaboticabal, concluindo em dezembro de 2016. Em dezembro de 2016 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária pela mesma Universidade, concluindo em fevereiro de 2019.

“Os homens sempre se consideraram mais inteligentes que os golfinhos porque conquistaram tanta coisa – a roda, Nova York, as guerras etc. –, enquanto os golfinhos só sabiam nadar e se divertir. Porém, os golfinhos, por sua vez, sempre se acharam muito mais inteligentes que os homens – exatamente pelos mesmos motivos”.

O guia do mochileiro das galáxias (Douglas Adams)

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela orientação, apoio e incentivo durante todo o tempo de doutorado, com ensinamentos que levarei para o resto de minha vida pessoal e acadêmica.

Às minhas coorientadoras e amigas, Dra. Elisângela Soares Gomes-Pepe, Dra. Natália Sarmanho Monteiro Lima e Dra. Pâmela Aparecida Maldaner Pereira, por todo apoio e confiança. Aprendi muito com vocês, exemplos de profissionalismo e dedicação, das quais me orgulho muito de ter trabalhado.

Às minhas amigas de laboratório e de vida, Natália, Micheli, Pâmela, Tatiane e Paula pela companhia diária, dentro e fora do laboratório, o apoio nos momentos de desespero e as diversas risadas compartilhadas.

A todos os pesquisadores que fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, que me auxiliaram nesta jornada.

À minha família que me apoiou, incentivou e confiou no meu esforço e trabalho, e esteve comigo nas horas em que mais precisei.

Às minhas amigas, Ana, Isabela, Fabi e todas as outras, por sempre tentarem me entender e me apoiarem nos piores dias a continuar e não desistir, por me acolherem nas horas de desespero e por estarem comigo nos melhores momentos.

Ao meu melhor amigo Alan, por ficar sempre do meu lado e me apoiar nos momentos mais difíceis que passei durante a conclusão do doutorado.

Ao Programa do Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001, pelo suporte oferecido para o desenvolvimento do trabalho.

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

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1. Características físico-químicas da biomassa lignocelulósica	2
2.2. Biomassa lignocelulósica e a produção de biocombustíveis	5
2.2.1. Combustível para aviões	7
2.2.2. Biobutanol	8
2.2.3. Biogás	8
2.2.4. Bioquímicos de valor agregado	9
2.2.5. Bioprodutos derivados da biomassa lignocelulósica	9
2.3. Enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa	11
2.3.1. Celulases	12
2.3.2. Hemicelulases	14
2.3.3. Enzimas ligninolíticas	15
3. Referências	27
CAPÍTULO 2 - Expressão, extração e ensaios de atividades preliminares de uma nova lacase com características termofílicas e alcalinas de <i>Chitinophaga</i> sp.	36
1. Introdução	37
2. Material e métodos	38
2.1. Origem da ORF codificadora da enzima Lac_CB10	38
2.2. Análise de domínios conservados e dendrograma fenético da lacase	39
2.3. Clonagem do gene Lac_CB10	40
2.4. Transformação de células competentes com as construções obtidas	41

2.5. Ensaaios de expressão da proteína recombinante	42
2.6. Extração e purificação da enzima Lac_CB10.....	43
2.7. Ligação ao cobre e determinação da concentração de enzima	45
2.8. Análise de UV-Visível	46
2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), “Western Blotting” e zimograma.....	46
2.10. Determinação da atividade da Lac_CB10	47
2.11. Degradação de Lignina pela Lac_CB10	48
2.12. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) da Degradação de Lignina.....	48
2.13. Análise estatística	49
3.Resultados e discussão.....	49
3.1. Clonagem do gene Lac_CB10	49
3.2. Expressão e extração enzimática	50
3.3. Predição funcional <i>in silico</i> e atividade em zimograma	60
3.4. Propriedades espectrais da enzima Lac_CB10	65
3.5. Caracterização bioquímica da Lac_CB10	68
3.6. Degradação Enzimática e Microscopia Eletrônica de Varredura de Lignina.....	75
4. Conclusão.....	77
5. Referências	77
CAPÍTULO 3 - Ensaaios de expressão heteróloga de uma mono-oxigenase lítica de polissacarídeo (LPMO) potencialmente envolvida com a desconstrução de biomas.	80
1.Introdução	81
2. Material e métodos	83
2.1. Prospecção dos genes em banco de dados e análise das sequências	83

2.2. Clonagem dos genes codificadores de LPMO	84
2.3. Transformação em células competentes com as construções obtidas	87
2.4. Ensaio de expressão e extração da proteína recombinante.....	88
3. Resultados e discussão.....	89
3.1. Análise das sequências.....	89
3.2. Amplificação e clonagem das ORFs	94
3.3. Expressão e purificação enzimática	97
4. Referências	102

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ESTUDO CINÉTICO DE OXIDOREDUTASES ENVOLVIDAS COM A DESCONSTRUÇÃO DA BIOMASSA

RESUMO – Atualmente, a aplicação de biocatalisadores em processos industriais impulsiona a exploração de novas enzimas, especialmente aquelas capazes de degradar material lignocelulósico, que pode ser potencialmente utilizado na fabricação de biocombustíveis e outros produtos de grande valor. O etanol de segunda geração é reconhecido como uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis, pois é produzido a partir de resíduos agroindustriais. As enzimas lacases e monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) apresentam um potencial biotecnológico em vários setores industriais, principalmente no setor de sacarificação da biomassa lignocelulósica. Neste cenário, um estudo foi realizado para caracterizar uma nova lacase, denominada Lac_CB10, prospectada de *Chitinophaga* sp. CB10. As lacases são relevantes em processos industriais por sua capacidade de oxidar compostos não fenólicos sem a necessidade de um mediador redox. A Lac_CB10 revelou propriedades extremófilas, mostrando atividade em condições altamente alcalinas (pH 10,5) e em altas temperaturas (80 - 90 °C), mantendo-se ativa acima de 50% por cinco horas nessas condições. Além disso, a análise espectral confirmou as características típicas das lacases amarelas, indicando seu potencial em aplicações industriais e na biorremediação ambiental, especialmente em ambientes extremos. O estudo com as LPMOs buscou expressar heterologicamente três novas LPMOs de diferentes origens (um metagenoma de torta de filtro, um consórcio degradador de biomassa e o genoma de *Bacillus thurigiensis*). Contudo, os resultados negativos indicaram desafios na expressão dessas enzimas, apontando a necessidade de investigação adicional sobre seu funcionamento. Essa pesquisa destaca as promissoras aplicações industriais de enzimas extremófilas, como a Lac_CB10, em diversas condições, bem como os desafios enfrentados na expressão das LPMOs, abrindo caminho para futuras explorações e avanços no campo das aplicações enzimáticas.

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica, enzimas, extremófila

HETEROLOGOUS EXPRESSION AND KINETIC STUDY OF OXIDOREDUCTASES INVOLVED WITH BIOMASS DECONSTRUCTION

ABSTRACT - Currently, the utilization of biocatalysts in industrial processes drives the exploration of new enzymes, especially those capable of degrading lignocellulosic material, potentially used in the production of biofuels and other high-value products. Second-generation ethanol is recognized as a sustainable substitute for fossil fuels as it is derived from agro-industrial waste. Enzymes such as laccases and lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) show biotechnological potential in various industrial sectors, particularly in the lignocellulosic biomass saccharification field. In this context, a study was conducted to characterize a new laccase, named Lac_CB10, isolated from *Chitinophaga* sp. CB10. Laccases are valuable in industrial processes due to their ability to oxidize non-phenolic compounds without the need for a redox mediator. Lac_CB10 demonstrated extremophilic properties, exhibiting activity in highly alkaline conditions (pH 10.5) and at high temperatures (80°C - 90°C), maintaining over 50% activity for five hours under these conditions. Furthermore, spectral analysis confirmed the typical features of yellow laccases, indicating its potential in industrial applications and environmental bioremediation, especially in extreme environments. The study involving LPMOs aimed to heterologously express three new LPMOs from different sources (a filter cake metagenome, a biomass-degrading consortium, and the *Bacillus thuringiensis* genome). However, the negative outcomes indicated challenges in expressing these enzymes, highlighting the need for further investigation into their functionality. These research endeavors collectively underscore the promising industrial applications of extremophilic enzymes, such as Lac_CB10, in diverse conditions, as well as the challenges encountered in LPMO expression, paving the way for future explorations and advancements in the field of enzymatic applications.

Keywords: Lignocellulosic biomass, enzymes, extremophile

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A capacidade das enzimas no âmbito biotecnológico tem despertado considerável interesse entre a comunidade de pesquisa, impulsionando uma busca contínua por variantes de enzimas que sejam não apenas mais eficazes, mas também capazes de otimizar significativamente os custos de produção em diversas áreas de aplicação.

As enzimas têm desempenhado papéis fundamentais em uma miríade de setores, abrangendo desde a produção de biocombustíveis (Robak e Balcerek, 2018), o tratamento de águas residuais (Cammara e Freire, 2006; Unuofin et al., 2019), a indústria têxtil (Madhavan et al., 2021), a fabricação de papel e celulose (Maijala et al., 2008; Choi et al., 2015), até a produção de alimentos (Akoh et al., 2008), bebidas (Uzuner e Cekmecelioglu, 2019), produtos farmacêuticos (Choi et al., 2015), substâncias químicas de alto valor (Nestl et al., 2011) e até mesmo aprimoramento da digestibilidade de ração animal (Ojha et al., 2019).

Isso ocorre porque as enzimas oferecem uma abordagem de biocatálise industrial que é vantajosa e ambientalmente sustentável. Operando sob condições de reação suaves, essas biomoléculas exibem uma notável eficiência e especificidade em suas funções. Além disso, a utilização de enzimas simplifica as rotas de produção, minimiza a geração de resíduos tóxicos e poluentes, e reduz significativamente o tempo necessário para a conclusão dos processos envolvidos (Akoh et al., 2008; Choi et al., 2015).

Apesar das inúmeras vantagens inerentes ao uso de enzimas, a implementação da digestão enzimática em escala industrial enfrenta desafios financeiros consideráveis. Isso se deve, em grande parte, ao custo ainda substancial das enzimas, muitas vezes agravado pela necessidade de importação e pelas contínuas melhorias exigidas nas formulações comerciais, visando aprimorar sua eficácia e estabilidade em face das adversidades típicas dos processos em que são empregadas (dos Santos et al., 2016; Johnson, 2016; Branco et al., 2019). Esses

desafios financeiros têm sido os principais impulsionadores por trás da incessante busca por novas enzimas e do contínuo progresso na engenharia enzimática, com o intuito de desenvolver enzimas mais robustas, estáveis, eficazes e de custo de produção mais acessível.

O conhecimento aprofundado sobre os mecanismos moleculares das enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica desempenha um papel crucial nas indústrias de biocombustíveis e bioprocessos. Esse entendimento não apenas impulsiona avanços tecnológicos, mas também promove o desenvolvimento de catalisadores mais eficazes e economicamente acessíveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características físico-químicas da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica representa o recurso renovável mais abundante em nosso planeta. Estimativas indicam que os subprodutos da agroindústria e os resíduos florestais totalizam cerca de 140 gigatoneladas (Tripathi et al., 2019). A utilização em larga escala dessa biomassa desempenha um papel significativo na promoção de uma economia com baixas emissões de carbono e na resposta às mudanças climáticas globais (Kumar et al., 2021).

A abundância desse recurso resultou em um crescente interesse na produção de materiais ecoamigáveis a partir desses resíduos agrícolas ao longo da última década (Mehta et al., 2020). No Brasil, uma variedade de formas de biomassa se destaca, com ênfase nos resíduos lignocelulósicos, que englobam resíduos florestais e agrícolas. Entre eles, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, provenientes da indústria sucroalcooleira, são os mais abundantes.

A Figura 1 ilustra a composição da biomassa lignocelulósica, onde a celulose se organiza em microfibrilas que são mantidas unidas pela hemicelulose e pela lignina, estabelecendo uma combinação de ligações de hidrogênio e ligações covalentes (Lee, 1997). Essa biomassa é caracterizada por conter os principais elementos dos resíduos vegetais, com destaque para a celulose (40-50%), a hemicelulose (20-30%) e a lignina

(10-15%). Adicionalmente, uma pequena fração da biomassa vegetal contém pectina, ceras e extratos, e a proporção de cada componente pode variar conforme a fonte, a parte da planta e a idade da biomassa (Naidu et al., 2018).

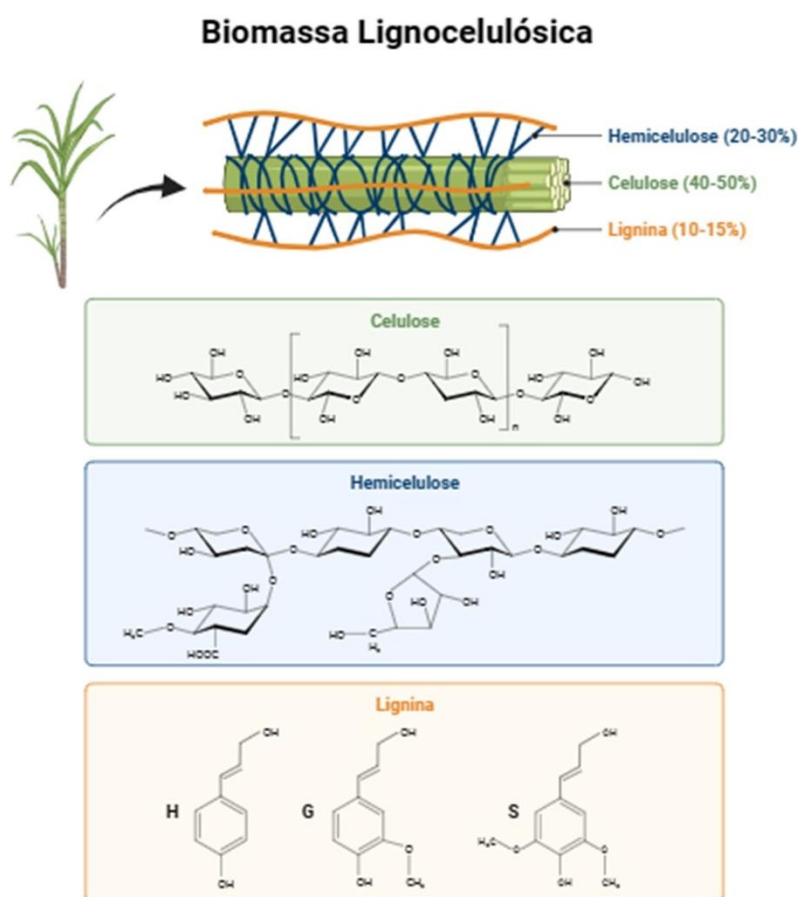


Figura 1. Composição geral da biomassa lignocelulósica, mostrando as frações de celulose, hemicelulose e lignina, bem como suas estruturas químicas. Template de “Lignocellulose Structure”, por BioRender.com (2024). Obtido em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

A celulose é o biopolímero mais abundante presente na biomassa lignocelulósica, formada por unidades de D-glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (Mussatto e Teixeira, 2010), bem como estão presentes por toda cadeia celulósica ligações de hidrogênio, que fazem com que as cadeias se organizem paralelas entre si, resultando em regiões cristalinas (Limayem e Ricke, 2012).

A lignina desempenha um papel fundamental ao fornecer a integridade estrutural e a rigidez na biomassa lignocelulósica. Ela está intimamente associada à

hemicelulose e celulose, atuando como uma substância adesiva que as mantém unidas (Naidu et al., 2018). Além disso, esse biopolímero é hidrofóbico, o que impede a penetração de água nas paredes celulares, proporcionando proteção à celulose e hemicelulose (Mokhothu e John, 2015) e impedindo a sua distensão (Maurya et al., 2015).

A lignina exibe uma notável resistência à degradação, tanto química quanto enzimática, o que contribui para a defesa eficaz da biomassa lignocelulósica contra possíveis ataques bacterianos (Mussatto e Teixeira, 2010; H. Isikgor e Remzi Becer, 2015). Contudo, existem organismos como os fungos de podridão branca, como *Pleurotus* sp., actinomicetos, como *Streptomyces* sp. e *Rhodococcus* sp., além de proteobactérias, como *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp., que possuem a capacidade de produzir enzimas oxidativas altamente eficazes para degradar essa biomassa (Harirchi et al.; Lee et al., 2019).

A hemicelulose é um heteropolímero que se compõe de uma variedade de monossacarídeos, incluindo pentoses, hexoses, açúcares acetilados e ácidos urônicos, e essa composição pode variar dependendo do tipo de planta de origem (Mussatto e Teixeira, 2010). Ao contrário da celulose, a hemicelulose apresenta cadeias mais curtas, é ramificada e não cristalina (Cunha e Gandini, 2010), porém, similarmente, são formadas por resíduos de β -D-pirranose, unidos por ligações β 1,4, como glicose, manose e xilose (Rose, 2003). A hemicelulose é categorizada em três subgrupos principais, conhecidos como mananas, xilanas e xiloglucanas, sendo as xilanas as mais prevalentes (Naidu et al., 2018). A Figura 2 ilustra os açúcares que compõem a maior parte das estruturas hemicelulósicas.

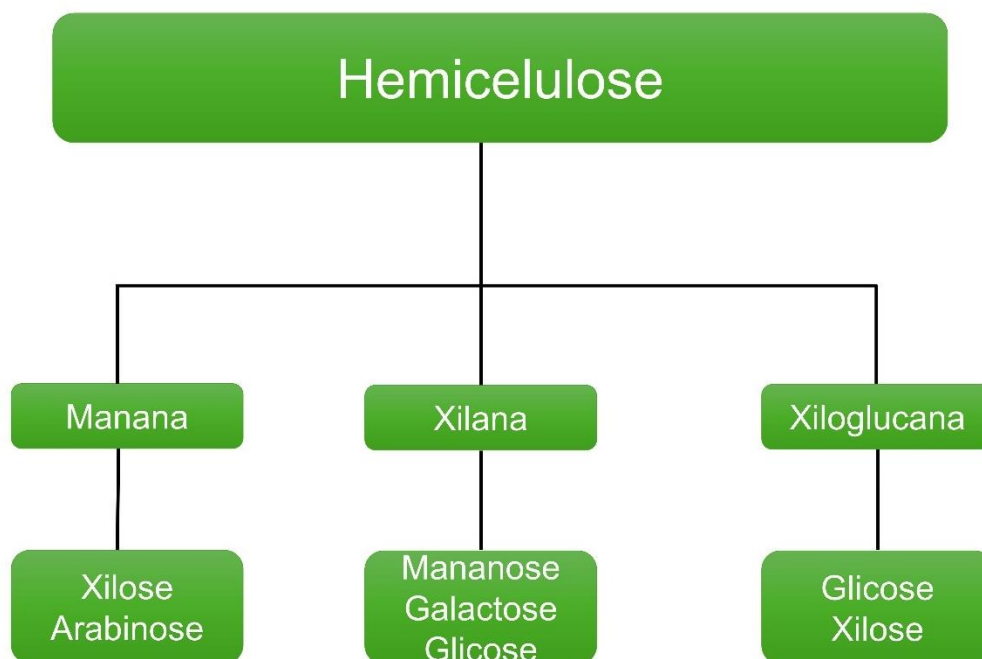


Figura 2. Diagrama de fluxo dos açúcares que compõe a hemicelulose. Adaptado de (Naidu et al., 2018)

2.2. Biomassa lignocelulósica e a produção de biocombustíveis

Atualmente, cerca de 80% da energia consumida no mundo provém de fontes não renováveis, ou seja, os combustíveis fósseis. Esta dependência tem ocasionado preocupações devido a crescente consciência ambiental, que tem intensificado a busca por fontes de energia produzidas a partir de fontes renováveis e ambientalmente amigáveis (Morales et al., 2015). A lignocelulose é uma alternativa promissora, pois é uma fonte orgânica com emissão zero de carbono e não compromete o abastecimento global de alimentos (Kumar et al., 2018). Globalmente são produzidas 181,5 bilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica por ano e somente cerca de 8,2 milhões são utilizadas (Dahmen et al., 2019).

Diversos métodos, tais como os processos termoquímicos, químicos e biológicos, são empregados para a conversão da lignocelulose em diversos tipos de bioprodutos de valor agregado, assim como em combustíveis de diferentes estados físicos, incluindo gasosos (como o biogás e o biohidrogênio), líquidos (tais como o biodiesel e o bioetanol), e sólidos (como os briquetes) (Bichot et al., 2020).

Com o objetivo de obter a fração mais eficiente da biomassa e desenvolver processos econômicos, ecológicos e sustentáveis para a biorrefinaria lignocelulósica, é essencial contar com um processo de fracionamento eficaz (Chuetor et al., 2021). Nesse contexto, a etapa de pré-tratamento desempenha um papel crucial, uma vez que modifica a estrutura lignocelulósica para extrair os constituintes individuais, aumentando a reatividade do material lignocelulósico para aplicações subsequentes e preservando as características iniciais dos constituintes (Bhatia et al., 2020) (Figura 3).

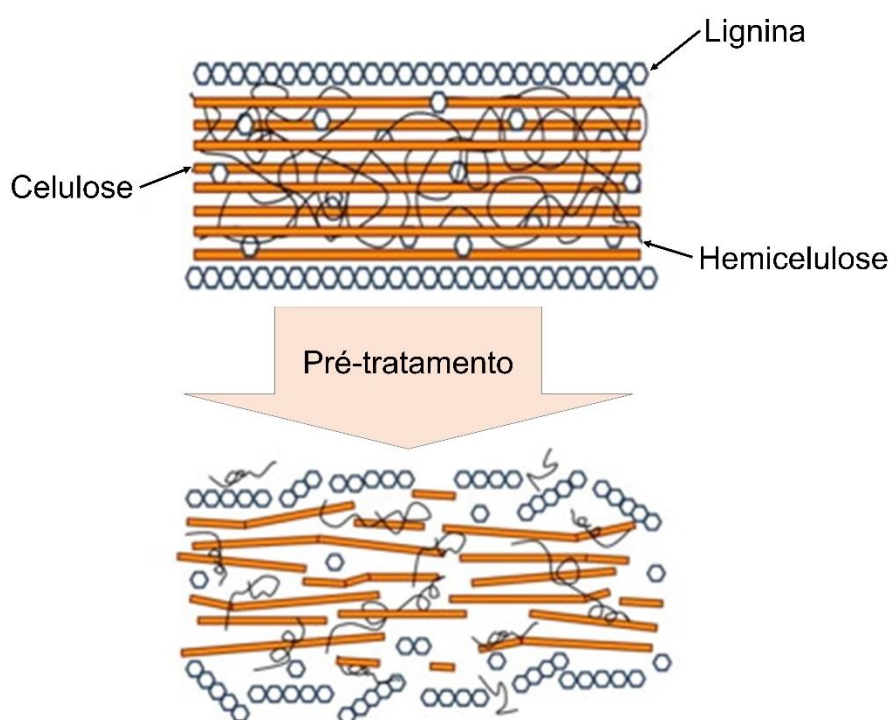


Figura 3. Esquema do efeito do pré-tratamento sobre a lignocelulose. Adaptado de (Haghighi Mood et al., 2013).

Existem quatro métodos de pré-tratamento disponíveis: físico, químico, físico-químico e biológico (Kumar et al., 2020). A combinação de um ou mais desses métodos é necessária para atingir a máxima eficiência, uma vez que apenas um método isolado não é capaz de degradar a biomassa de maneira adequada para a obtenção dos resultados desejados (Ashokkumar et al., 2022).

O etanol de segunda geração (2G) destaca-se entre os biocombustíveis derivados de biomassa lignocelulósica, sobretudo pela sua capacidade de aumentar a produtividade de etanol sem a necessidade de expandir a área cultivada (Pereira et al., 2015), além de seu potencial para diminuir a dependência de combustíveis fósseis. A síntese desse bioetanol envolve rotas termoquímicas e biológicas, nas quais a parte resistente da lignina é degradada em moléculas simples que são então convertidas em etanol (Ashokkumar et al., 2022).

No entanto, a recalcitrância da biomassa resulta em custos de produção mais elevados em comparação com o etanol de primeira geração. Isso se deve à necessidade de importação e à baixa atividade catalítica das enzimas utilizadas na hidrólise da biomassa (dos Santos et al., 2016; Robak e Balcerek, 2018; Branco et al., 2019; Malico et al., 2019). Enzimas como celulasas e hemicelulasas podem auxiliar na hidrólise dos componentes de lignocelulose, convertendo-os em unidades de monossacarídeos (açúcares) que são posteriormente fermentados por leveduras e bactérias para produzir etanol. No entanto, a complexidade dos métodos de pré-tratamento e os desafios econômicos e técnicos na conversão da biomassa representam obstáculos significativos na produção de bioetanol (Mu et al., 2010).

Além do etanol de segunda geração outros tipos de biocombustíveis são produzidos a partir da biomassa lignocelulósica, bem como bioquímicos de valor agregado e bioprodutos derivados de lignina, celulose e hemicelulose.

2.2.1. Combustível para aviões

A indústria da aviação é um importante meio de transporte, movendo milhões de pessoas e toneladas de carga anualmente. No entanto, seu uso de querosene como combustível contribui significativamente para as emissões de CO₂, sendo responsável por cerca de 2,5% das emissões globais. Isso levanta preocupações sobre o aquecimento global. Uma alternativa sustentável é o combustível de aviação, produzido a partir de fontes renováveis (SAF), como biomassa lignocelulósica. O SAF atende aos padrões de combustível de aviação e tem o potencial de satisfazer uma parcela significativa da demanda energética da aviação até 2040, de acordo com a

Agência Internacional de Energia. A produção do SAF envolve métodos bioquímicos e termoquímicos, usando resíduos biogênicos e óleos vegetais como matéria-prima. No entanto, desafios relacionados a custos e políticas de impostos precisam ser superados para viabilizar sua produção em larga escala em comparação com combustíveis fósseis (Transport – Topics - IEA; Eswaran et al., 2021; Zelt, 2018).

2.2.2. Biobutanol

O biobutanol, produzido a partir de biomassa lignocelulósica, apresenta várias vantagens em relação ao bioetanol, como imiscibilidade na água, facilidade de transporte e armazenamento, baixa toxicidade e alto conteúdo energético. A fabricação é realizada por empresas como a Butamax e a Gevo, com ampla gama de coprodutos de alto valor, contribuindo para o crescimento econômico (Huang et al., 2015; Bellido et al., 2014). O processo de produção envolve a fermentação de diversas matérias-primas de biomassa, utilizando a fermentação de acetona-butanol-etanol (ABE) com desafios relacionados ao baixo rendimento, toxicidade do butanol para microrganismos, recuperação do butanol e custos mais elevados em comparação com o processo petroquímico (US\$ 1,87/kg vs. US\$ 1,52/kg). Pesquisas futuras devem se concentrar na redução dos custos de processamento do biobutanol, explorando estratégias como mutagênese, proteômica e tecnologia baseada em DNA recombinante (Jiang et al., 2015).

2.2.3. Biogás

O biogás é uma valiosa fonte de energia renovável, especialmente como alternativa à gasolina. Ele é gerado a partir de matéria orgânica através de digestão anaeróbica, resultando principalmente em dióxido de carbono e metano (CO_2 e CH_4), além de vestígios de sulfetos de hidrogênio e siloxanos. O processo de digestão ocorre na ausência de oxigênio e é conduzido por organismos anaeróbios que podem decompor matérias-primas biodegradáveis, como resíduos verdes, resíduos de

alimentos, materiais agrícolas, resíduos urbanos, esgoto e compostos, em sistemas fechados conhecidos como biorreatores, biodigestores ou digestores anaeróbicos.

A produção de biogás oferece oportunidades econômicas e de emprego em áreas rurais, através do gerenciamento de resíduos e valorização da biomassa. A eficiência da produção de biogás é influenciada por vários fatores, incluindo pH, temperatura, tempo de retenção, relação C/N e taxa de carga orgânica. Os microrganismos usados no processo variam de acordo com sua sensibilidade à temperatura. No entanto, a utilização de matéria-prima à base de lignocelulose no processo de digestão anaeróbica é limitada devido à resistência dos componentes internos da biomassa, resultando em baixa taxa de digestão. Para superar esse desafio, estão sendo desenvolvidos processos de co-digestão, métodos de pré-tratamento, uso de inóculos microbianos e aditivos químicos e biológicos para melhorar o desempenho da produção de biogás (Okolie et al., 2021; Mao et al., 2015).

2.2.4. Bioquímicos de valor agregado

Os carboidratos, polissacarídeos encontrados na lignocelulose, são convertidos em monossacarídeos, como glicose e frutose, e intermediários solúveis através de reações de despolimerização realizadas por hidrólise enzimática ou ácida. Esses açúcares resultantes são posteriormente transformados em uma variedade de produtos químicos orgânicos de alto valor, incluindo substâncias como 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural, ácido levulínico (LA), ácido 2,5-furandicarboxílico (FDCA), γ -valerolactona (GVL), 2,5-dimetilfurano (DMF), dióis, etanol e hidrocarbonetos líquidos, por meio de processos de síntese seletiva (Mariscal et al., 2016).

2.2.5. Bioprodutos derivados da biomassa lignocelulósica

A lignocelulose, composta por celulose e hemicelulose, fornece carboidratos que desempenham um papel fundamental na produção de bioenergia e diversos

produtos químicos orgânicos de baixa massa molecular, como etanol, metanol, ácido acético, ácido fórmico, 5-hidroximetilfurfural e outros compostos. A lignina, por outro lado, é um componente macromolecular resistente que encontra aplicação na fabricação de polímeros aromáticos sintéticos, incluindo poliamidas, resinas, termoplásticos e filmes compostos (Ashokkumar et al., 2022).

Para aproveitar ao máximo a biomassa, é eficaz adotar uma abordagem em cascata que envolva uma série de procedimentos de pré-tratamento, seguidos pela separação dos diferentes componentes da biomassa. Esse método representa uma alternativa mais sustentável em comparação com abordagens ineficientes baseadas em métodos termoquímicos e bioquímicos. Dentre os vários procedimentos de pré-tratamento, técnicas avançadas, como o uso de fluidos supercríticos (CO_2 , H_2O e etanol), irradiação ultrassônica, perturbação de campo eletromagnético, cavitação hidrodinâmica e protocolos de pré-tratamento com líquidos iônicos (IL), têm se destacado como os métodos mais eficazes para dissolver e hidrolisar os componentes da biomassa (Ashokkumar et al., 2022).

Na Figura 4 é possível observar os bioprodutos derivados da biomassa lignocelulósica.

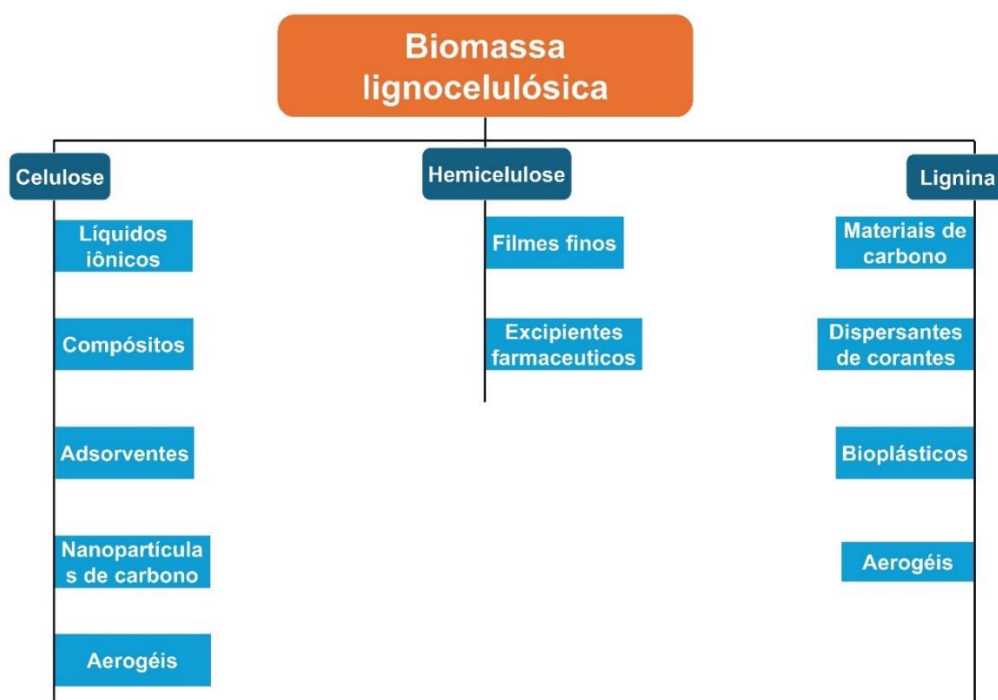


Figura 4. Bioprodutos de alto valor derivados dos componentes da biomassa lignocelulósica. Adaptado de (Ashokkumar et al., 2022).

2.3. Enzimas envolvidas na sacarificação da biomassa

O desafio principal para a utilização eficiente da biomassa reside na elevada recalcitrância da lignina, a qual pode ser superada por meio de métodos de pré-tratamento eficazes (Nargotra et al., 2019; Sharma et al., 2018). Esse processo torna possível a hidrólise dos componentes da biomassa por meio de enzimas lignolíticas, convertendo a matriz em açúcares que se tornam disponíveis para a produção de uma ampla variedade de produtos de significativa importância na indústria (Saldarriaga-Hernández et al., 2020).

Dentre essas enzimas, destacam-se as enzimas lignocelulolíticas, como celulasas e hemicelulasas, que desempenham a função de quebrar a celulose e hemicelulose em açúcares mais simples, que posteriormente podem ser convertidos em diversos produtos. Paralelamente, as enzimas ligninolíticas são responsáveis por degradar a lignina em compostos aromáticos (Iram et al., 2020).

De forma geral, as enzimas são divididas de acordo com o tipo de reação que catalisam, e recebem uma codificação numérica definida pela “Enzyme Commission”, que corresponde ao número E.C, formando seis classes, sendo eles: Oxidoredutases (EC 1), catalisam reações de oxirredução; Transferases (EC 2), catalisam a transferência de grupos entre moléculas; Hidrolases (EC 3), catalisam a reação de hidrólise de várias ligações; Liases (EC 4), catalisam a clivagem de ligações covalentes; Isomerases (EC 5), catalisam a transferência de grupos em uma mesma molécula e Ligases (EC 6), ligam as moléculas por meio de ligações covalentes (Drula et al., 2022).

As enzimas responsáveis por hidrolisar a biomassa lignocelulósica em formas mais simples são classificadas como enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) e estão registradas no banco de dados CAZy (Zerva et al., 2021). Esse banco de dados oferece uma plataforma online que mantém a categorização de famílias de CAZymes constantemente atualizada, onde a identificação de novas CAZymes pode ser conduzida por meio de abordagens ômicas, como metagenômica, proteômica e transcriptômica, eliminando a necessidade de isolar e cultivar microrganismos para a produção de enzimas (Lombard et al., 2014; Drula et al., 2022).

2.3.1. Celulases

As celulases são um grupo de enzimas hidrolíticas responsáveis por romper as ligações β -1,4 glicosídicas presentes na celulose, resultando em produtos importantes, como glicose, celobiose e celo-oligosacarídeos (Houfani et al., 2020). Essas enzimas pertencem a categoria de CAZymes, possuindo domínios funcionais que permitem a ligação a carboidratos, possibilitando a modificação, degradação ou criação de ligações glicosídicas. São ainda classificadas de acordo com seus mecanismos de ação catalítica, incluindo as endoglucanases, exoglucanases ou celobiohidrolases e β -glicosidases, atuando sinergicamente em um sistema multifacetado, cooperando na hidrólise interna da celulose (Madhavan et al., 2021; Houfani et al., 2020).

O processo de hidrólise das celulases se inicia com a ação das endoglucanases, que cortam aleatoriamente as ligações β -1,4 glicosídicas, liberando extremidades redutora e não redutoras, que serão alvo para as exoglucanases, desencadeando a liberação de cadeias de celulose, que, por fim, são hidrolisados em açúcares pela β -glicosidase (Agrawal e Verma, 2022; Banner et al., 2021) (Figura 5).

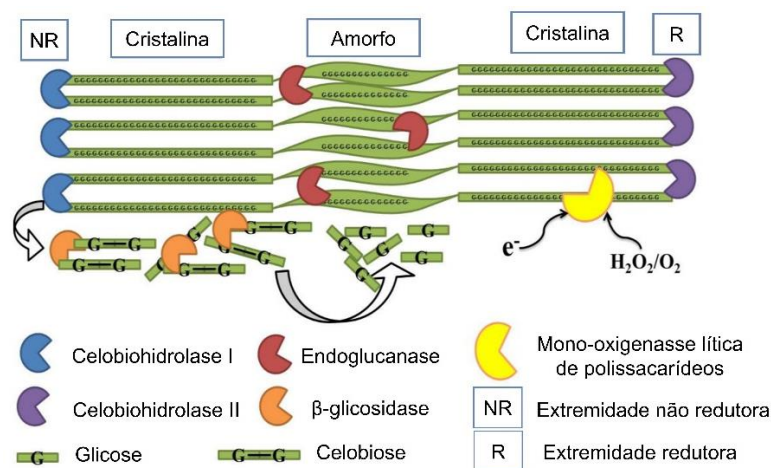


Figura 5. Processo de hidrólise das celulases na biomassa vegetal. A quebra da celulose por hidrólise começa com a atuação das endoglucanases, que cortam as ligações β -1,4 glicosídicas de forma aleatória, resultando em extremidades com diferentes propriedades redutoras. Essas extremidades servem como alvo para as exoglucanases, as quais desencadeiam a liberação de cadeias de celulose. Posteriormente, essas cadeias são convertidas em açúcares pela ação da β -glicosidase.

Além das enzimas centrais na hidrólise da celulose, o processo também conta com enzimas capazes de hidrolisar os açúcares das cadeias laterais, como esterases, mananases e lacases (Agrawal e Verma, 2022), bem como requer o envolvimento das polissacarídeos monooxigenases (LPMOs), que são enzimas não hidrolíticas que podem clivar cadeias de celulose, quebrando ligações β -1,4 e oxidando átomos de oxigênio em unidades de glicose C1 ou C4, ocasionando a hidrólise de oligossacarídeos e polissacarídeos (Wu et al., 2022).

2.3.1.1. Endoglucanases

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) pertencem a família das glicosil hidrolases (GH) que desempenham um papel crucial na biodegradação (Akram et al., 2018). Elas iniciam a quebra da celulose, reduzindo seu grau de polimerização e atuam aleatoriamente nas ligações β -1,4-glicosídicas nas áreas amorfas internas das cadeias de celulose, gerando oligossacarídeos (Houfani et al., 2020; Sanjeevi et al., 2022). As endoglucanases se distribuem em 13 famílias de GHs, com a maioria das versões termoestáveis pertencendo à família GH12 (Akram et al., 2018).

2.3.1.2. Exoglucanases

As exoglucanases (EC. 3.2.1.91), também conhecidas como celobiohidrolases (CBH), incluem CBHI e CBHII, agindo nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose, respectivamente. Elas produzem celobiose e, em menor quantidade, celotriose (Houfani et al., 2020; Hiras et al., 2016; Annamalai et al., 2016).

A celobiose é predominantemente produzida na extremidade redutora da cadeia de celulose pelas exoglucanases das famílias de glicosídeo hidrolase 7 e 48, enquanto as exoglucanases da família GH6 produzem principalmente celobiose a partir da extremidade não redutora da cadeia (Hiras et al., 2016). As celobiohidrolases são produzidas por uma variedade de bactérias e fungos, sendo que as CBHs da família GH 7 são produzidas principalmente por fungos, enquanto as da família GH 48 são produzidas por bactérias (Annamalai et al., 2016).

2.3.1.3. β -Glicosidases

As β -D glicosidases (BGL), também conhecidas como celobiasas (EC 3.2.1.21), desempenham o papel final na hidrólise da celulose, convertendo celodextrina solúvel e celobiose em unidades de D-glicose (Yao et al., 2016). As BGLs são cruciais para o sistema de degradação da celulose, pois ativam o complexo enzimático celulase, sintetizando gentiobiose e soforose (Naraian e Gautam, 2018). Com base nas sequências de aminoácidos, as BGLs são agrupadas nas famílias GH1, GH3, GH5, GH9 e GH30 (Singhania et al., 2017).

A produção de BGL também é estimulada pela glicose e é classificada nas famílias GH1 e GH3 (Srivastava et al., 2019) e desempenham um papel fundamental na produção de biocombustíveis e na prevenção da repressão catabólica da endoglucanase e da celobiohidrolase. No entanto, sua produção é geralmente escassa em microrganismos e até em preparações comerciais de celulase. Portanto, para formar um coquetel celulolítico eficaz, o aumento da presença de BGL no coquetel enzimático é indispensável e pode resultar em um aumento da produção de açúcar (Singhania et al., 2017).

2.3.2. Hemicelulases

A degradação da hemicelulose envolve um conjunto de enzimas, a maioria das quais é de natureza hidrolítica e atua de maneira semelhante às enzimas celulolíticas (Saldarriaga-Hernández et al., 2020). As xilanases desempenham um papel fundamental, pois atacam a cadeia primária do xilano, reduzindo a capacidade do substrato de polimerização por meio da hidrólise das ligações β -D-xilopiranosil, resultando na liberação de xilobiose, xilooligossacarídeos e xilose (Sharma et al., 2020).

Após a ação das xilanases, as β -xilosidases iniciam um processo de desintegração progressiva, agindo nos extremos não reduzidos dos xilooligossacarídeos e produzindo xilose como produto (Najjarzadeh et al., 2020). Entre as enzimas ativas na hemicelulose, aquelas específicas para xilano e

glucomanano têm recebido maior atenção. As enzimas hemicelulolíticas, em geral, incluem as que hidrolisam a cadeia principal, como as endo- β -1,4-xilanases (xilanases), endo- β -1,4-mananases (mananases) e enzimas desramificadoras que auxiliam na remoção de substituições na estrutura polissacarídica, como desacetilases, arabinosidases e galactosidases (Østby et al., 2020).

As β -xilosidases (EC 3.2.1.37) desempenham um papel crucial atuando na extremidade não redutora dos xilooligossacarídeos, convertendo oligômeros curtos em monômeros. Sua afinidade com os oligossacarídeos é inversamente correlacionada com o grau de polimerização (Binod et al., 2019; Alokika e Singh, 2019). Já as arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) são responsáveis por clivar resíduos α -1,2-, α -1,3- e α -1,5-l-arabinofuranosil em polissacarídeos/arabino-oligossacarídeos, atuando nas extremidades não redutoras. Essas enzimas pertencem a várias famílias de glicosídeo hidrolase, como GH30, GH43, GH51, GH54 e GH62 (Alokika e Singh, 2019; Contesini et al., 2017).

Esterases, como a acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) e a esterase do ácido ferúlico (EC 3.1.1.73), desempenham papéis específicos na quebra de ligações acetil-éster e feruloil-éster em xilano e glucuronoarabinoxilano, respectivamente (Binod et al., 2019) e as α -glucuronidases (EC 3.2.1.131) atuam na hidrólise da ligação α -1,2-glicosídica entre o ácido D-glucurônico ou seu éter 4-O-metilico e a unidade xilopiranosil terminal não redutora de xilooligossacarídeos (Alokika e Singh, 2019).

De uma maneira geral, as xilanases são de grande importância devido ao alto teor de xilana na hemicelulose e têm diversas aplicações na indústria, incluindo biorrefinarias lignocelulósicas, indústria de alimentos, papel e celulose, entre outras (Alokika & Singh, 2019).

2.3.3. Enzimas ligninolíticas

As enzimas modificadoras de lignina (LMEs) desempenham um papel essencial na degradação da lignina associada à biomassa lignocelulósica. Por não atuarem diretamente sobre os carboidratos, mas auxiliar outras enzimas no processo, as LMEs foram categorizadas como Atividades Auxiliares (AAs) no banco de dados CAZy,

abrangendo nove famílias de enzimas lignolíticas e seis famílias de monooxigenases de polissacarídeos líticos (LPMOs) (<http://www.cazy.org/>).

Dentre as enzimas LMEs mais significativas estão as lignina peroxidases (EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (EC 1.11.1.13) e lacases (EC 1.10.3.2), além de enzimas acessórias (Falade et al., 2017).

As lignina peroxidases e manganês peroxidases, encontradas em fungos e bactérias, pertencem à classe de heme-peroxidases do tipo II. Elas desempenham a oxidação de substratos orgânicos e inorgânicos na presença de peróxido de hidrogênio e contêm um grupo heme. Enquanto as lignina peroxidases atuam em compostos não fenólicos da lignina, liberando radicais aril-cátion, as manganês peroxidases catalisam a oxidação do íon Mn^{2+} para formar Mn^{3+} e, em seguida, oxidam as frações fenólicas da lignina para produzir radicais livres (Vrsanska et al., 2016; Falade et al., 2017).

2.3.3.1. Lacases

As multicobre oxidases (MCOs) são uma superfamília de proteínas caracterizadas pela presença de dois ou três domínios de cupredoxina, importantes para o desempenho catalítico da enzima, uma vez que contém resíduos altamente conservados de histidina e cisteína que coordenam os átomos de cobre (Makwana e Mahalakshmi, 2015) e são o local de ligação entre substrato e enzima (Pardo et al., 2016).

De acordo com o “Laccase and Multicopper Oxidase Engineering Database (LccED)” (Gräff et al., 2020; Sirim et al., 2011), as MCOs são agrupados em 105 famílias homólogas e 16 superfamílias, das quais 11 contêm enzimas com três domínios de cupredoxina, e apenas uma superfamília está associada a seis domínios. Das 16 superfamílias, oito são principalmente encontradas em organismos eucarióticos, incluindo fungos, plantas e insetos; sete estão em bactérias; e apenas uma superfamília, composta por dois domínios, é encontrada em arqueias.

As lacases representam a maior subfamília dentro das MCOs e se destacam por sua capacidade oxirredutora. Elas possuem a habilidade de oxidar substratos e reduzir o oxigênio em água, uma característica essencial das MCOs (Larrondo et al.,

2004). Esse atributo as torna versáteis, capazes de oxidar uma ampla gama de substratos, incluindo fenólicos, não fenólicos e aminas aromáticas (Balcázar-López et al., 2016). Como resultado, elas têm um grande potencial em aplicações biotecnológicas e industriais, abrangendo deslignificação e branqueamento de celulose, biorremediação, setores têxteis, alimentícios, farmacêuticos e na produção de bioetanol (Fang et al., 2015).

Para garantir o correto desempenho catalítico, as lacases, assim como toda a superfamília de MCOs, apresentam quatro átomos de cobre distribuídos em três centros de cupredoxina: T1, T2 e T3. O centro de cobre tipo 1 (T1), também conhecido como cobre azul, é responsável pela oxidação dos elétrons e absorve luz na região de 600 nm. Já os centros de cobre tipo 2 (T2) ou cobre normal, e tipo 3 (T3) ou binucleares acoplados, absorvem a luz em torno de 300 nm, formando o centro trinuclear catalítico. É neste centro trinuclear que ocorre a redução da molécula de oxigênio, sendo convertida em água (Bento et al., 2006) (Figura 6).

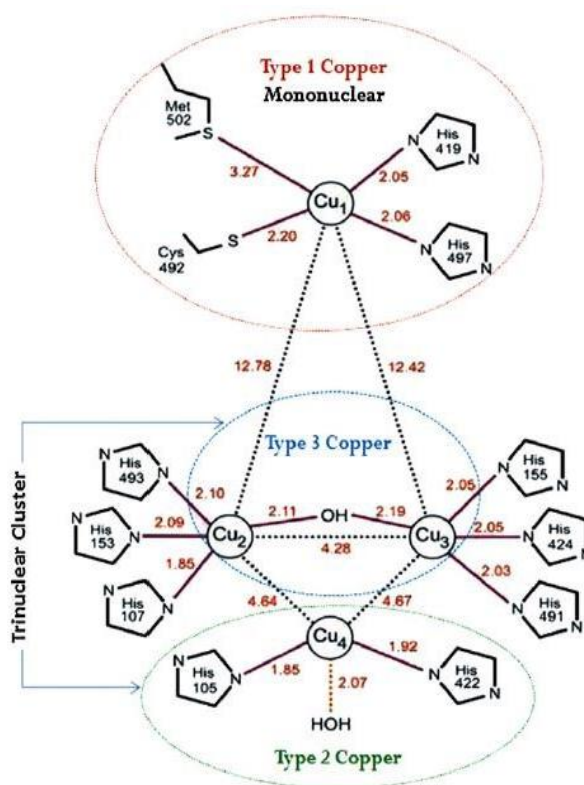


Figura 6. Representação esquemática do arranjo dos centros de ligação ao cobre encontrado nas MCOs (Kunamneni et al., 2008).

Em sua grande maioria as lacases possuem os dois picos de absorção nos centros de cobre T1 (600 nm) e T2/T3 (300 nm), sendo chamadas de lacases azuis. Em contrapartida, algumas lacases apresentam somente um pico de absorção em torno de 300 nm (centros T2/T3), sendo chamadas por alguns autores de "lacases amarelas," enquanto outros as descrevem como "lacases brancas" (Chaoua et al., 2023; Leontievsky et al., 1997). No entanto, ambas as denominações são amplamente aceitas para descrever esse tipo de lacase devido às características espectrais que elas exibem (Giardina et al., 2010; Baldrian, 2006).

Os átomos de cobre são coordenados por um resíduo de metionina, um resíduo de cisteína e 10 resíduos de histidina altamente conservados. Essas histidinas estão localizadas dentro das assinaturas L1 (H-W-H-G), L2 (H-X-H), L3 (H-P-x-H-L-H-G-H) e L4 (H-C-H-X-X-X-H-X-X-X-X-M/L/F) (Reiss et al., 2013). Os padrões conservados L1 e L3 são específicos para as lacases, sendo que o padrão L1 possui uma histidina que se liga ao sítio de cobre T2 e outra histidina que se liga ao sítio T3, enquanto a sequência L3 possui ligantes em todos os três sítios de cobre (T1, T2 e T3) (Sirim et al., 2011a). Já os motivos L2 e L4 são conservados em todas as subfamílias de MCOs (Sharma et al., 2007).

A compreensão dos motivos conservados em enzimas já conhecidas desempenha um papel fundamental na busca e identificação de alvos em genomas sequenciados. Além disso, os motivos encontrados em metagenomas são utilizados como um critério de triagem inicial para a identificação de enzimas de interesse. Isso ocorre porque, na primeira etapa de triagem, as enzimas de outras classes são prontamente descartadas.

A maioria das MCOs com atividade típica possui três domínios de cobre, embora algumas lacases apresentem apenas dois. Estas são conhecidas como "small" lacases (SLACs) e são ativas apenas na forma oligomérica, utilizando os sítios adjacentes de cada monômero para formar o centro de cupredoxina ausente. Além disso, algumas MCOs se apresentam em formas multiméricas, como as ceruloplasminas, que possuem seis domínios de cupredoxina (Murphy et al., 2008).

Nos processos industriais atuais, as lacases são frequentemente derivadas de fungos, que, embora tenham sido historicamente estudados, apresentam limitações em sua aplicação devido a suas exigências de condições extremas, como

temperaturas altas ou baixas, pH ácido ou alcalino e altas concentrações de sal (Wang e Zhao, 2017). Em contraste, as lacases bacterianas têm ganhado destaque na indústria devido à sua ampla especificidade de substrato e produção rápida de enzimas (Christopher et al., 2014). O potencial das lacases bacterianas na biotecnologia é realçado pela capacidade de várias espécies bacterianas habitarem ambientes fisicoquimicamente extremos.

A capacidade de decompor poluentes no ambiente é uma das aplicações mais valiosas dessas oxidoredutases, superando todas as outras utilizações industriais e biotecnológicas (Husain, 2006). Além do seu uso na biorremediação, as lacases desempenham um papel crucial nas indústrias alimentícias, têxteis, de celulose e papel (Antošová e Sychrová, 2016). Nesse contexto, destacam-se a remoção de lignina e o processo de branqueamento da celulose como aplicações de grande relevância (Chandra e Chowdhary, 2015). Mais recentemente, tem havido um aumento de interesse no desenvolvimento de biossensores para detecção e eliminação de poluentes tóxicos, na concepção de células de biocombustível e na operação de dispositivos de diagnóstico médico (Patel et al., 2019).

É notável que a capacidade dessas enzimas de polimerizar fenóis naturais permita sua utilização na fabricação de pigmentos para produtos cosméticos, corantes para cabelo, desodorantes, pastas de dentes, enxaguantes bucais, entre outros. Um uso recentemente descoberto dessa enzima é sua aplicação na criação de biossensores baseados em nanopartículas para aplicações médicas e farmacêuticas (Dwivedi et al., 2011).

2.3.3.1.1. Indústria alimentícia

Na indústria alimentícia, as lacases têm demonstrado utilidade em diversos setores. Por exemplo, nas cervejarias, onde o armazenamento prolongado da cerveja pode ocasionar turvações devido à formação de complexos com polifenóis, as lacases são empregadas para remover o oxigênio residual, assim prolongando a vida útil da bebida (Patel et al., 2019). Outra aplicação significativa das lacases é na estabilização do vinho. No processo de produção vinícola, as etapas consecutivas de prensagem

podem gerar polifenóis e compostos fenólicos que influenciam tanto na cor quanto no sabor (Minussi et al., 2002).

Com sua habilidade de reticular biopolímeros, as lacases são empregadas para aprimorar o volume, textura, frescor e sabor do pão. Ao adicionar essas enzimas à massa, fortalecem-se as estruturas de glúten durante o processo de cozimento (Minussi et al., 2002). Por outro lado, os sucos de fruta contêm compostos fenólicos e produtos oxidativos que contribuem para sua cor e sabor. No entanto, a polimerização e oxidação desses fenóis podem levar a alterações na cor e no aroma do suco. Elevadas concentrações de polifenóis podem resultar em um indesejável escurecimento enzimático do suco (Ribeiro et al., 2010). Assim, as lacases são empregadas para estabilizar os sucos de fruta, prevenindo tais mudanças indesejadas.

2.3.3.1.2. Indústria têxtil

Os efluentes coloridos provenientes da indústria têxtil são uma das principais causas de perturbação dos ecossistemas, devido ao alto teor de compostos orgânicos, inclusive substâncias cancerígenas. Esses poluentes podem levar ao crescimento excessivo da vegetação aquática e à morte da vida animal, devido à falta de oxigênio. Portanto, a necessidade de descolorir esses efluentes se tornou uma questão fundamental para a preservação dos ecossistemas (Konstantinou e Albanis, 2004).

Para abordar essa questão, as lacases podem ser empregadas com sucesso, desde que sejam utilizadas em conjunto com estabilizadores específicos (Cameron et al., 2000). Além disso, essas enzimas desempenham um papel crucial no branqueamento de diversos tipos de tecidos, com destaque para o processo de branqueamento de jeans na indústria têxtil (Yavuz et al., 2014; Tzanov et al., 2003). É importante mencionar que as lacases também contribuem para a produção de cor, ao oxidar compostos aromáticos, resultando na obtenção de corantes industriais, como fenoxazina e corantes azo (Sousa et al., 2013).

2.3.3.1.3. Indústria de cosméticos

O número de patentes registradas associadas à utilização de lacases na indústria cosmética tem apresentado um aumento notável nos últimos anos (Patel et al., 2019). Produtos químicos perigosos e potencialmente cancerígenos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e as fenilenodiaminas, são frequentemente empregados em agentes de coloração capilar, podendo também desencadear reações alérgicas (Chen et al., 2006; Huang et al., 2007). Em vista disso, as lacases possuem a capacidade de eliminar essas substâncias prejudiciais devido às suas propriedades oxidantes, além de desempenharem um papel valioso como biocatalisadores na fabricação de corantes capilares, desodorantes, perfumes, sabonetes e até mesmo pastas de dente (Mano e Durand, 2013; Brinch e Pedersen, 2002).

As lacases também estão sendo utilizadas na coloração capilar, empregadas como agentes descolorantes, muitas vezes em combinação com hidroxiestilbenos. De forma notável, as tinturas capilares que incluem lacases são mais suaves e menos propensas a causar irritações na pele. Além disso, na área dermatológica, os cremes clareadores ricos em proteínas, desenvolvidos recentemente, incorporam uma quantidade específica de lacases (Golz-Berner et al., 2004).

2.3.3.1.4. Biorremediação

Recentemente, houve um aumento no uso de diversos pesticidas e herbicidas na agricultura, visando o aumento da produtividade. Contudo, a principal preocupação está nos efeitos adversos dessas substâncias para o meio ambiente, afetando os recursos do ar, solo e água. Entre todos os tipos de pesticidas e herbicidas, destacam-se compostos como o benzeno, o diclorodifeniltricloroetano, os bifenilos policlorados e os compostos aromáticos policíclicos, devido à sua alta mutagenicidade e carcinogenicidade, representando ameaças tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (Patel et al., 2019).

Felizmente, as lacases têm demonstrado ser eficazes na eliminação desses poluentes mencionados. Nas últimas décadas, o crescimento populacional, práticas globais inadequadas e estratégias de eliminação ineficazes impactaram negativamente os recursos de água potável, levando ao surgimento de contaminantes emergentes. Essas substâncias químicas podem perturbar os ecossistemas de formas desconhecidas (Ahmed et al., 2017).

Adicionalmente, os desreguladores endócrinos (DEs), que incluem substâncias farmacêuticas e de cuidados pessoais, representam um subgrupo significativo de poluentes. Esses compostos químicos têm a capacidade de imitar funções hormonais em diversos organismos, resultando em perturbações no sistema endócrino frequentemente associadas a anomalias sexuais, doenças malignas e até doenças crônicas (Daughton e Ternes, 1999; Rezg et al., 2014). Sistemas assistidos por lacase têm se mostrado eficazes na decomposição desses desreguladores químicos (Barrios-Estrada et al., 2018).

2.3.3.1.5. Indústria de papel e celulose

As lacases, enzimas altamente versáteis, têm desempenhado um papel revolucionário nas indústrias de papel e celulose. Além de contribuir para tornar a polpa mais brilhante, desempenham um papel fundamental na remoção de extratos lipofílicos de polpas de papel, sejam elas de origem lenhosa ou não. As lacases têm a capacidade de formar radicais reativos ao interagir com a lignina, tornando as fibras lignocelulósicas mais funcionais. Isso resulta em melhorias significativas nas características físico-químicas e mecânicas da polpa (Khatami et al., 2022).

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima essencial para a indústria de celulose e papel, que se concentra na separação da lignina e das frações celulósicas da biomassa. As lacases foram identificadas como uma ferramenta altamente eficaz para o processo de deslignificação e desintoxicação de materiais lignocelulósicos pré-tratados, melhorando substancialmente os processos subsequentes de sacarificação e fermentação (Fillat et al., 2017).

No contexto específico da produção de celulose a partir do eucalipto, que é uma importante fonte comercial, as lacases desempenham um papel crucial no

processo de branqueamento biológico da polpa kraft obtida (Rodríguez-Escribano et al., 2022). Além disso, essas enzimas têm a capacidade de ativar a lignina ligada às fibras durante o processo de fabricação, o que resulta na produção de placas de fibra resistentes, sem a necessidade de utilizar cola sintética tóxica (Hüttermann et al., 2001; Felby et al., 1997; Virk et al., 2012). Essas enzimas também podem ser empregadas para a remoção da tinta em jornais antigos, em conjunto com a ação de celulasas e hemicelulasas (Xu et al., 2009).

Todas essas aplicações tornaram as lacases uma das enzimas mais promissoras para as abordagens atuais e futuras na produção industrial de papel (Virk et al., 2012).

2.3.3.2. Monooxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs)

As monooxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs) (EC 1.14.99.54) são enzimas oxirredutases que se destacam por seu alto potencial oxidativo e sua importância na elaboração de coquetéis enzimáticos devido a sua alta capacidade sinérgica (Leite, Ana E., 2017). Elas desempenham um papel eficiente na degradação enzimática da celulose, pois são capazes de clivar oxidativamente as ligações glicosídicas, tornando o substrato mais suscetível à hidrólise pelas celulasas (Villares et al., 2017), o que as tornam componentes centrais nos coquetéis enzimáticos utilizados na indústria de etanol de segunda geração (Harris et al., 2014; Johansen, 2016).

Naturalmente, as LPMOs são encontradas em fungos e bactérias, sendo mais abundantes em fungos saprófitos. Algumas espécies fúngicas podem conter mais de 30 genes que codificam essas enzimas (Levasseur et al., 2013). As LPMOs foram classificadas no banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>) como enzimas de atividade auxiliar (AA) e divididas em quatro famílias, sendo AA9, antigamente classificadas como GHs 61, AA10, que eram chamadas de família de módulos de ligação a carboidratos 33 (CBM 33), AA11 e AA13 (Eijsink et al., 2019a; Hemsworth et al., 2014).

As enzimas das famílias AA9 e AA11, predominantemente de origem fúngica, podem atuar em diversos substratos, como celulose, oligossacarídeos, hemicelulose,

quitina e xilana (Solomon et al., 2014; Bennati-Granier et al., 2015; Hemsworth et al., 2014; Frommhagen et al., 2015). Por outro lado, as LPMOs da família AA10 são mais frequentes em genomas bacterianos e virais. Inicialmente, acreditava-se que essas enzimas estavam ligadas à quitina sem função catalítica, mas agora se sabe que também são ativas na celulose e quitina (Forsberg et al., 2014). Quanto às enzimas pertencentes à família AA13, foram identificadas apenas em fungos e têm atividade em derivados de amido (Vu et al., 2014; Forsberg et al., 2019).

As LPMOs promovem a quebra das cadeias de polissacarídeos usando o oxigênio molecular como agente oxidante para clivar as ligações glicosídicas. Essa reação depende de agentes redutores externos e ocorre em um sítio ativo de cobre na superfície da proteína, conhecido como braçadeira de histidina (Frandsen et al., 2016). Esses agentes redutores podem variar desde pequenas moléculas contendo ascorbato, enxofre, pirogalol ou ácido gálico, até sistemas mais complexos, como celobiose desidrogenase (CDH), glicose-metanol-colina oxirredutases ou pigmentos fotossintéticos, como as clorofilas (Cannella et al., 2016; Garajova et al., 2016).

Na figura 7A é possível observar a forma LPMO-Cu (II) (representada pelo átomo de cobre em laranja) que é convertida em sua forma Cu(I) (indicada pela esfera em azul) por meio da ação de um parceiro redox, que pode ser um pequeno redutor orgânico, uma proteína redox ou uma molécula fotoativada. As moléculas de LPMO-Cu(I) que permanecem não ligadas, por exemplo, devido à ausência de um substrato adequado, têm a capacidade de catalisar uma reação de oxidase, resultando na produção de H_2O_2 , e são suscetíveis à inativação oxidativa. Por outro lado, as moléculas de LPMO-Cu(I) que estão ligadas ao polissacarídeo desencadearão uma reação de peroxigenase que leva à clivagem da cadeia. Vale mencionar que existe uma reação alternativa e hipotética da monooxygenase, indicada entre parênteses, que envolve a entrega de dois elétrons e dois prótons em cada ciclo catalítico (Bissaro & Eijssink, 2023).

A Figura 7B ajuda a visualizar como a enzima interage com o seu ambiente e como seu sítio ativo é seletivo para determinadas moléculas. A imagem representa um modelo de uma enzima LPMO (do tipo AA10) que está ligada a uma molécula de β -quitina. Uma parte destacada na imagem mostra a existência de um túnel que conecta o local ativo da enzima com o ambiente circundante, incluindo certos resíduos

(representados como bastões amarelos) chamados Glu60 e Asn185. Esses resíduos têm um papel importante, pois limitam a entrada no túnel apenas a moléculas pequenas, como O_2 (oxigênio), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) ou H_2O (água). Além disso, a chave para a compreensão do funcionamento da enzima, a histidina, é mostrada como bastões azuis (Bissaro & Eijsink, 2023).

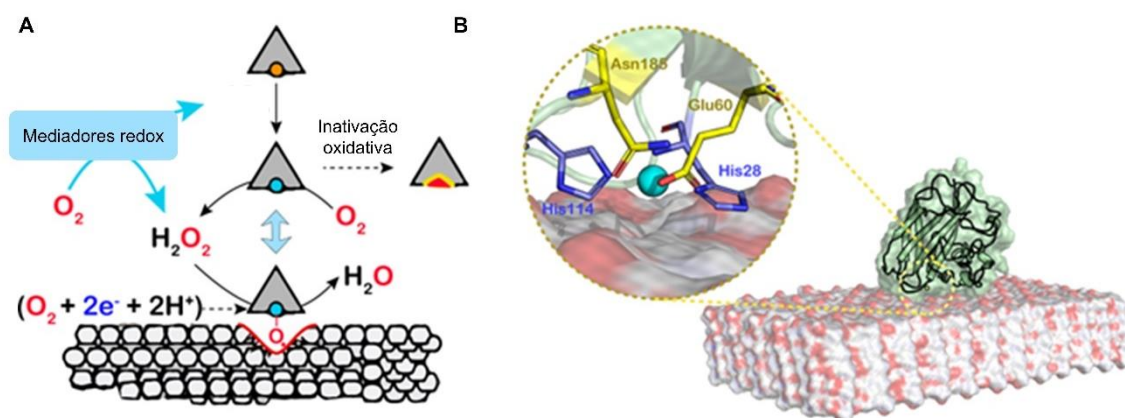


Figura 7. Esquema da ação da peroxigenase das LPMOs em um polissacarídeo cristalino. (A) A forma LPMO-Cu (II), representada por uma esfera laranja, é reduzida para a forma Cu (I), representada por uma esfera azul, por um mediador redox. Moléculas de LPMO-Cu (I) que permanecem no estado não ligado (por exemplo, devido à falta de um substrato genuíno) podem catalisar uma reação de oxidase (produção de H_2O_2) e estão sujeitas à inativação oxidativa. Já as moléculas de LPMO-Cu (I) ligadas ao polissacarídeo catalisam uma reação de peroxigenase, resultando na clivagem da cadeia. Uma reação alternativa e hipotética de monooxigenase é indicada entre parênteses, implicando na entrega de dois elétrons e dois prótons por ciclo catalítico. B. (B) O modelo retrata uma LPMO (AA10 de *Serratia marcescens*) ligada à β -quitina. A figura inclui uma inserção que detalha a entrada para um túnel conectando o sítio ativo ao solvente em massa. Nessa inserção, os resíduos Glu60 e Asn185 são destacados como hastes amarelas, os quais restringem a acessibilidade do túnel a pequenas moléculas, como O_2 , H_2O_2 ou H_2O . Além disso, o braço de histidina é representado por hastes azuis. Fonte: (Bissaro & Eijsink, 2023).

Além das diferentes especificidades de substratos, as LPMOs também diferem em relação à posição da reação. Todas as enzimas da família AA10 realizam a oxidação no carbono C1, enquanto nas enzimas da família AA9, a oxidação já foi relatada nos carbonos C1, C4 ou C6. Independentemente das diferenças, a sequência de histidina do sítio ativo é conservada em todas as famílias, e todas são dependentes

de cobre para a função catalítica (Beeson et al., 2012; Westereng et al., 2011; Donovan Hedegård e Ryde, 2018).

As LPMOs das famílias AA9 e AA10 compartilham semelhanças estruturais e contêm um sítio de ligação altamente conservado para metal (Hemsworth et al., 2013). Estudos de cristalografia e EPR (electron paramagnetic resonance) em membros da família AA9 revelaram que essas enzimas possuem um sítio de ligação de cobre tipo 2. Nesse sítio, o cobre possui seis ligantes, incluindo quatro no plano equatorial, duas histidinas altamente conservadas e uma glutamina funcionalmente importante, que coordena uma molécula de água. Além disso, há ligantes axiais, como um grupo hidroxila ligado a uma tirosina e outra molécula de água (Harris et al., 2010; Hemsworth et al., 2013; Forsberg et al., 2018).

Estudos semelhantes em membros da família AA10 mostraram que essas enzimas também apresentam um gancho de histidina em forma de T. No entanto, o sítio de ligação de cobre da família AA10 possui apenas ligantes no plano equatorial, e algumas modificações notáveis incluem a substituição da tirosina por fenilalanina e a ausência da glutamina que coordena a água axial. O acesso ao sítio axial é mediado por uma alanina em vez de uma glutamina (Hemsworth et al., 2013). Outra diferença relevante envolve a metilação da histidina N-terminal, com enzimas da família AA9 frequentemente apresentando essa modificação, enquanto na família AA10 tal metilação não foi observada (Forsberg et al., 2014).

Estudos demonstram que as LPMOs têm a capacidade de degradar uma variedade de substratos polissacarídicos, incluindo amido, xiloglucanos, celodextrinas e glucomanas. Esses substratos fazem parte da composição da hemicelulose e lignocelulose das paredes vegetais (Bennati-Granier et al., 2015). Essa ampla capacidade de degradação torna as LPMOs valiosas em setores industriais que enfrentam desafios na quebra de materiais resistentes, como a lignina e a celulose.

Conforme mencionado anteriormente, uma aplicação emergente das LPMOs ocorre nas indústrias de sacarificação de lignocelulose, onde a eficiência e a redução de custos são fundamentais para o sucesso do processo biotecnológico. O uso dessas enzimas em coquetéis enzimáticos tem demonstrado ser eficaz na redução dos custos de produção (Johansen, 2016). Gouvêa e colaboradores (2019) mostraram que uma LPMO (AA9) caracterizada era capaz de aumentar em 22% a atividade de um coquetel

enzimático comercial, demonstrando assim um grande potencial para a indústria de etanol de segunda geração.

3. REFERÊNCIAS

- Agrawal, K. & Verma, P. (2022). *Biomass Conv. Bioref.* 12, 4939–4958.
- Ahmed, I., M. N. Iqbal, H., Tecnológico de Monterrey, School of Engineering and Sciences, Campus Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501, Monterrey, N.L., CP 64849, Mexico, Dhama, K., & Division of Pathology, ICAR-Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, Bareilly, Uttar Pradesh, India; (2017). *JEBAS* 5, 402–411.
- Akoh, C. C., Chang, S.-W., Lee, G.-C. & Shaw, J.-F. (2008). *J. Agric. Food Chem.* 56, 10445–10451.
- Akram, F., Haq, I. U., Imran, W. & Mukhtar, H. (2018). *Renewable Energy* 122, 225–238.
- Alokika & Singh, B. (2019). *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 8763–8784.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V. & Sivakumar, N. (2016). Vol. 3, *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass*, edited by V. K. Gupta. pp. 29–35. Cham: Springer International Publishing.
- Antošová, Z. & Sychrová, H. (2016). *Mol Biotechnol* 58, 93–116.
- Ashokkumar, V., Venkatkarthick, R., Jayashree, S., Chuetor, S., Dharmaraj, S., Kumar, G., Chen, W.-H. & Ngamcharussrivichai, C. (2022). *Bioresource Technology* 344, 126195.
- Balcázar-López, E., Méndez-Lorenzo, L. H., Batista-García, R. A., Esquivel-Naranjo, U., Ayala, M., Kumar, V. V., Savary, O., Cabana, H., Herrera-Estrella, A. & Folch-Mallol, J. L. (2016). *PLOS ONE* 11, e0147997.
- Baldrian, P. (2006). *FEMS Microbiology Reviews* 30, 215–242.
- Banner, A., Toogood, H. S. & Scrutton, N. S. (2021). *Microorganisms* 9, 1079.
- Barrios-Estrada, C., de Jesús Rostro-Alanis, M., Muñoz-Gutiérrez, B. D., Iqbal, H. M. N., Kannan, S. & Parra-Saldívar, R. (2018). *Science of The Total Environment* 612, 1516–1531.
- Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H. D. & Marletta, M. A. (2012). *J. Am. Chem. Soc.* 134, 890–892.
- Bellido, C., Loureiro Pinto, M., Coca, M., González-Benito, G. & García-Cubero, M. T. (2014). *Bioresource Technology* 167, 198–205.

- Bennati-Granier, C., Garajova, S., Champion, C., Grisel, S., Haon, M., Zhou, S., Fanuel, M., Ropartz, D., Rogniaux, H., Gimbert, I., Record, E. & Berrin, J.-G. (2015). *Biotechnol Biofuels* 8, 90.
- Bento, I., Carrondo, M. A. & Lindley, P. F. (2006). *J Biol Inorg Chem* 11, 539–547.
- Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., Rajesh Banu, J., Rao, C. V., Kim, Y.-G. & Yang, Y.-H. (2020). *Bioresource Technology* 300, 122724.
- Bichot, A., Lerosty, M., Radoiu, M., Méchin, V., Bernet, N., Delgenès, J.-P. & García-Bernet, D. (2020). *Energy Conversion and Management* 203, 112220.
- Binod, P., Gnansounou, E., Sindhu, R. & Pandey, A. (2019). *Bioresource Technology Reports* 5, 317–325.
- Bissaro, B. & Eijsink, V. G. H. (2023). *Essays in Biochemistry* 67, 575–584.
- Branco, R. H. R., Serafim, L. S. & Xavier, A. M. R. B. (2019). *Fermentation* 5, 4.
- Brinch, D. S. & Pedersen, P. B. (2002). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 35, 296–307.
- Cameron, M. D., Timofeevski, S. & Aust, S. D. (2000). *Appl Microbiol Biotechnol* 54, 751–758.
- Cammarota, M. C. & Freire, D. M. G. (2006). *Bioresource Technology* 97, 2195–2210.
- Cannella, D., Möllers, K. B., Frigaard, N.-U., Jensen, P. E., Bjerrum, M. J., Johansen, K. S. & Felby, C. (2016). *Nat Commun* 7, 11134.
- Chandra, R. & Chowdhary, P. (2015). *Environ. Sci.: Processes Impacts* 17, 326–342.
- Chaoua, S., Chaouche, N. K., Songulashvili, G., Gares, M., Hiligsmann, S. & Flahaut, S. (2023). *Journal of Biotechnology* 361, 99–109.
- Chen, S.-C., Chen, C.-H., Chern, C.-L., Hsu, L.-S., Huang, Y.-C., Chung, K.-T. & Chye, S.-M. (2006). *Toxicology in Vitro* 20, 801–807.
- Choi, J.-M., Han, S.-S. & Kim, H.-S. (2015). *Biotechnology Advances* 33, 1443–1454.
- Christopher, L. P., Yao, B. & Ji, Y. (2014). *Frontiers in Energy Research* 2.
- Chuetor, S., Ruiz, T., Barakat, A., Laosiripojana, N., Champreda, V. & Sriariyanun, M. (2021). *Bioresource Technology* 323, 124619.
- Contesini, F. J., Liberato, M. V., Rubio, M. V., Calzado, F., Zubieta, M. P., Riaño-Pachón, D. M., Squina, F. M., Bracht, F., Skaf, M. S. & Damasio, A. R. (2017). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1865, 1758–1769.
- Cunha, A. G. & Gandini, A. (2010). *Cellulose* 17, 875–889.

- Dahmen, N., Lewandowski, I., Zibek, S. & Weidtmann, A. (2019). *GCB Bioenergy* 11, 107–117.
- Daughton, C. G. & Ternes, T. A. (1999). *Environmental Health Perspectives* 107, 907–938.
- Donovan Hedegård, E. & Ryde, U. (2018). *Chemical Science* 9, 3866–3880.
- Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B. & Terrapon, N. (2022). *Nucleic Acids Research* 50, D571–D577.
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P. & Kumar, A. (2011). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68, 117–128.
- Eijsink, V. G. H., Petrovic, D., Forsberg, Z., Mekasha, S., Røhr, Å. K., Várnai, A., Bissaro, B. & Vaaje-Kolstad, G. (2019). *Biotechnology for Biofuels* 12, 58.
- Eswaran, S., Subramaniam, S., Geleynse, S., Brandt, K., Wolcott, M. & Zhang, X. (2021). *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 151, 111516.
- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V. & Okoh, A. I. (2017). *MicrobiologyOpen* 6, e00394.
- Fang, Z., Liu, X., Chen, L., Shen, Y., Zhang, X., Fang, W., Wang, X., Bao, X. & Xiao, Y. (2015). *Biotechnology for Biofuels* 8, 54.
- Felby, C., Pedersen, L. S. & Nielsen, B. R. (1997). 51, 281–286.
- Fillat, Ú., Ibarra, D., Eugenio, M. E., Moreno, A. D., Tomás-Pejó, E. & Martín-Sampedro, R. (2017). *Fermentation* 3, 17.
- Forsberg, Z., Bissaro, B., Gullesen, J., Dalhus, B., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2018). *Journal of Biological Chemistry* 293, 1397–1412.
- Forsberg, Z., Mackenzie, A. K., Sørli, M., Røhr, Å. K., Helland, R., Arvai, A. S., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2014). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 8446–8451.
- Forsberg, Z., Sørli, M., Petrović, D., Courtade, G., Aachmann, F. L., Vaaje-Kolstad, G., Bissaro, B., Røhr, Å. K. & Eijsink, V. G. (2019). *Current Opinion in Structural Biology* 59, 54–64.
- Frandsen, K. E. H., Simmons, T. J., Dupree, P., Poulsen, J.-C. N., Hemsworth, G. R., Ciano, L., Johnston, E. M., Tovborg, M., Johansen, K. S., von Freiesleben, P., Marmuse, L., Fort, S., Cottaz, S., Driguez, H., Henrissat, B., Lenfant, N., Tuna, F., Baldansuren, A., Davies, G. J., Lo Leggio, L. & Walton, P. H. (2016). *Nat Chem Biol* 12, 298–303.

Frommhagen, M., Sforza, S., Westphal, A. H., Visser, J., Hinz, S. W. A., Koetsier, M. J., van Berkel, W. J. H., Gruppen, H. & Kabel, M. A. (2015). *Biotechnology for Biofuels* 8, 101.

Garajova, S., Mathieu, Y., Beccia, M. R., Bennati-Granier, C., Biaso, F., Fanuel, M., Ropartz, D., Guigliarelli, B., Record, E., Rogniaux, H., Henrissat, B. & Berrin, J.-G. (2016). *Sci Rep* 6, 28276.

Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. & Sannia, G. (2010). *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 369–385.

Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L. & Doucet, O. (2004). Cosmetic or dermatological preparation with skin-lightening proteins.

Gräff, M., Buchholz, P. C. F., Le Roes-Hill, M. & Pleiss, J. (2020). *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 88, 1329–1339.

Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G. H., Gholami, M. & Ardjmand, M. (2013). *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 77–93.

Harirchi, S., Wainaina, S., Sar, T., Nojoudi, S. A., Parchami, M., Parchami, M., Varjani, S., Khanal, S. K., Wong, J., Awasthi, M. K. & Taherzadeh, M. J. *Bioengineered* 13, 6521–6557.

Harris, P. V., Welner, D., McFarland, K. C., Re, E., Navarro Poulsen, J.-C., Brown, K., Salbo, R., Ding, H., Vlasenko, E., Merino, S., Xu, F., Cherry, J., Larsen, S. & Lo Leggio, L. (2010). *Biochemistry* 49, 3305–3316.

Harris, P. V., Xu, F., Kreel, N. E., Kang, C. & Fukuyama, S. (2014). *Current Opinion in Chemical Biology* 19, 162–170.

Hemsworth, G. R., Henrissat, B., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2014). *Nat Chem Biol* 10, 122–126.

Hemsworth, G. R., Taylor, E. J., Kim, R. Q., Gregory, R. C., Lewis, S. J., Turkenburg, J. P., Parkin, A., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2013). *J. Am. Chem. Soc.* 135, 6069–6077.

Hiras, J., Wu, Y.-W., Deng, K., Nicora, C. D., Aldrich, J. T., Frey, D., Kolinko, S., Robinson, E. W., Jacobs, J. M., Adams, P. D., Northen, T. R., Simmons, B. A. & Singer, S. W. (2016). *mBio* 7, e01106-16.

H. Isikgor, F. & Remzi Becer, C. (2015). *Polymer Chemistry* 6, 4497–4559.

Houfani, A. A., Anders, N., Spiess, A. C., Baldrian, P. & Benallaoua, S. (2020). *Biomass and Bioenergy* 134, 105481.

Huang, H., Singh, V. & Qureshi, N. (2015). *Biotechnol Biofuels* 8, 147.

- Huang, Y.-C., Hung, W.-C., Kang, W.-Y., Chen, W.-T. & Chai, C.-Y. (2007). *Toxicology Letters* 170, 116–123.
- Husain, Q. (2006). *Critical Reviews in Biotechnology* 26, 201–221.
- Hüttermann, A., Mai, C. & Kharazipour, A. (2001). *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 387–394.
- Iram, A., Cekmecelioglu, D. & Demirci, A. (2020). *Processes* 9, 38.
- Jiang, Y., Liu, J., Jiang, W., Yang, Y. & Yang, S. (2015). *Biotechnology Advances* 33, 1493–1501.
- Johansen, K. S. (2016). *Biochemical Society Transactions* 44, 143–149.
- Johnson, E. (2016). *Biofuels Bioprod Bioref* 10, 164–174.
- Khatami, S. H., Vakili, O., Movahedpour, A., Ghesmati, Z., Ghasemi, H. & Taheri-Anganeh, M. (2022). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 69, 2658–2672.
- Konstantinou, I. K. & Albanis, T. A. (2004). *Applied Catalysis B: Environmental* 49, 1–14.
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K. & Singhania, R. R. (2021). *Bioresource Technology* 323, 124566.
- Kumar, V., Binod, P., Sindhu, R., Gnansounou, E. & Ahluwalia, V. (2018). *Bioresource Technology* 269, 443–451.
- Kumar, V., Yadav, S. K., Kumar, J. & Ahluwalia, V. (2020). *Bioresource Technology* 299, 122633.
- Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A. & Alcalde, M. (2008). *BIOT* 2, 10–24.
- Larrondo, L. F., González, B., Cullen, D. & Vicuña, R. 2004 *Microbiology* 150, 2775–2783.
- Lee, J. (1997). *Journal of Biotechnology* 56, 1–24.
- Lee, S., Kang, M., Bae, J.-H., Sohn, J.-H. & Sung, B. H. (2019). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N. & Golovleva, L. (1997). *FEBS Letters* 413, 446–448.
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2013). *Biotechnology for Biofuels* 6, 41.
- Limayem, A. & Ricke, S. C. (2012). *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 449–467.

- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2014). *Nucleic Acids Research* 42, D490–D495.
- Madhavan, A., Arun, K. B., Binod, P., Sirohi, R., Tarafdar, A., Reshmy, R., Kumar Awasthi, M. & Sindhu, R. (2021). *Bioresource Technology* 325, 124617.
- Maijala, P., Kleen, M., Westin, C., Poppius-Levlin, K., Herranen, K., Lehto, J. H., Reponen, P., Mäentausta, O., Mettälä, A. & Hatakka, A. (2008). *Enzyme and Microbial Technology* 43, 169–177.
- Makwana, K. M. & Mahalakshmi, R. (2015). *Protein Science* 24, 1920–1933.
- Malico, I., Nepomuceno Pereira, R., Gonçalves, A. C. & Sousa, A. M. O. (2019). *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 112, 960–977.
- Mano, N. & Durand, F. (2013). Laccase of *podospora anserina* and uses of same.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X. & Ren, G. (2015). *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 45, 540–555.
- Mariscal, R., Maireles-Torres, P., Ojeda, M., Sádaba, I. & Granados, M. L. (2016). *Energy Environ. Sci.* 9, 1144–1189.
- Maurya, D. P., Singla, A. & Negi, S. (2015). *3 Biotech* 5, 597–609.
- Mehta, S., Jha, S. & Liang, H. (2020). *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 134, 110345.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M. & Durán, N. (2002). *Trends in Food Science & Technology* 13, 205–216.
- Mokhothu, T. H. & John, M. J. (2015). *Carbohydrate Polymers* 131, 337–354.
- Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R. & Aroca, G. (2015). *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42, 1349–1361.
- Mu, D., Seager, T., Rao, P. S. & Zhao, F. (2010). *Environmental Management* 46, 565–578.
- Murphy, M. E. P., Lindley, P. F. & Adman, E. T. (2008). *Protein Science* 6, 761–770.
- Mussatto, S. I. & Teixeira, J. A. (2010).
- Naidu, D. S., Hlangothi, S. P. & John, M. J. (2018). *Carbohydrate Polymers* 179, 28–41.
- Najjarzadeh, N., Matsakas, L., Rova, U. & Christakopoulos, P. (2020). *Molecules* 25, 5849.
- Naraian, R. & Gautam, R. L. (2018). Vol. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. pp. 121–136. Elsevier.

- Nestl, B. M., Nebel, B. A. & Hauer, B. (2011). *Current Opinion in Chemical Biology* 15, 187–193.
- Ojha, B. K., Singh, P. K. & Shrivastava, N. (2019). Vol. *Enzymes in Food Biotechnology*. pp. 93–109. Elsevier.
- Okolie, J. A., Mukherjee, A., Nanda, S., Dalai, A. K. & Kozinski, J. A. (2021). *International Journal of Energy Research* 45, 14145–14169.
- Østby, H., Hansen, L. D., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. & Várnai, A. (2020). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 47, 623–657.
- Pardo, I., Santiago, G., Gentili, P., Lucas, F., Monza, E., Medrano, F. J., Galli, C., Martínez, A. T., Guallar, V. & Camarero, S. (2016). *Catal. Sci. Technol.* 6, 3900–3910.
- Patel, N., Shahane, S., Shivam, Majumdar, R. & Mishra, U. (2019). *BIOT* 13, 19–32.
- Pereira, S. C., Maehara, L., Machado, C. M. M. & Farinas, C. S. (2015). *Biotechnology for Biofuels* 8, 44.
- Reiss, R., Ihssen, J., Richter, M., Eichhorn, E., Schilling, B. & Thöny-Meyer, L. (2013). *PLOS ONE* 8, e65633.
- Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N. & Mornagui, B. (2014). *Environment International* 64, 83–90.
- Ribeiro, D. S., Henrique, S. M. B., Oliveira, L. S., Macedo, G. A. & Fleuri, L. F. (2010). *International Journal of Food Science & Technology* 45, 635–641.
- Robak, K. & Balcerek, M. (2018). *Food Technol Biotechnol* 56, 174–187.
- Rodríguez-Escribano, D., Pliego-Magán, R., De Salas, F., Aza, P., Gentili, P., Ihalainen, P., Levée, T., Meyer, V., Petit-Conil, M., Tapin-Lingua, S., Lecourt, M. & Camarero, S. (2022). *Biotechnol Biofuels* 15, 149.
- Rose, J. K. C. (2003). *The Plant Cell Wall* CRC Press.
- Saldarriaga-Hernández, S., Velasco-Ayala, C., Leal-Isla Flores, P., de Jesús Rostro-Alanis, M., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H. M. N. & Carrillo-Nieves, D. (2020). *International Journal of Biological Macromolecules* 161, 1099–1116.
- Sanjeevi, M., Hebbar, P. N., Aiswarya, N., Rashmi, S., Rahul, C. N., Mohan, A., Jeyakanthan, J. & Sekar, K. (2022). Vol. *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods*, edited by T. Tripathi & V. K. Dubey. pp. 405–437. Academic Press.
- dos Santos, L. V., de Barros Grassi, M. C., Gallardo, J. C. M., Pirolla, R. A. S., Calderón, L. L., de Carvalho-Netto, O. V., Parreiras, L. S., Camargo, E. L. O., Drezza, A. L., Missawa, S. K., Teixeira, G. S., Lunardi, I., Bressiani, J. & Pereira, G. A. G. (2016). *Industrial Biotechnology* 12, 40–57.

- Sharma, P., Goel, R. & Capalash, N. (2007). *World J Microbiol Biotechnol* 23, 823–832.
- Sharma, S., Sharma, V., Nargotra, P. & Bajaj, B. K. (2020). *SN Appl. Sci.* 2, 739.
- Sharma, V., Bhat, B., Gupta, M., Vaid, S., Sharma, S., Nargotra, P., Singh, S. & Bajaj, B. K. (2018). Vol. *Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy*, edited by O. V. Singh & A. K. Chandel. pp. 5–55. Cham: Springer International Publishing.
- Sharma, V., Nargotra, P. & Bajaj, B. K. (2019). *Bioresource Technology* 285, 121319.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Pandey, A. & Ganansounou, E. (2017). *Bioresource Technology* 245, 1352–1361.
- Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R. D. & Pleiss, J. (2011). *Database* 2011, bar006–bar006.
- Solomon, E. I., Heppner, D. E., Johnston, E. M., Ginsbach, J. W., Cirera, J., Qayyum, M., Kieber-Emmons, M. T., Kjaergaard, C. H., Hadt, R. G. & Tian, L. (2014). *Chem. Rev.* 114, 3659–3853.
- Sousa, A. C., Martins, L. O. & Robalo, M. P. (2013). *Advanced Synthesis & Catalysis* 355, 2908–2917.
- Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V. K., Sengar, R. S., Gupta, V. K., Mazumder, P. B., Khan, A. F. & Mishra, P. K. (2019). *Biomolecules* 9, 220.
- Transport – Topics - IEA <https://www.iea.org/topics/transport>.
- Tripathi, N., Hills, C. D., Singh, R. S. & Atkinson, C. J. (2019). *Npj Clim Atmos Sci* 2, 1–10.
- Tzanov, T., Basto, C., Gübitz, G. M. & Cavaco-Paulo, A. (2003). *Macromolecular Materials and Engineering* 288, 807–810.
- Unuofin, J. O., Okoh, A. I. & Nwodo, U. U. (2019). *Molecules* 24, 2064.
- Uzuner, S. & Cekmecelioglu, D. (2019). Vol. *Enzymes in Food Biotechnology*. pp. 29–43. Elsevier.
- Villares, A., Moreau, C., Bennati-Granier, C., Garajova, S., Foucat, L., Falourd, X., Saake, B., Berrin, J.-G. & Cathala, B. (2017). *Sci Rep* 7, 40262.
- Virk, A. P., Sharma, P. & Capalash, N. (2012). *Biotechnology Progress* 28, 21–32.
- Vrsanska, M., Voberkova, S., Langer, V., Palovcikova, D., Moulick, A., Adam, V. & Kopel, P. (2016). *Molecules* 21, 1553.

- Vu, V. V., Beeson, W. T., Span, E. A., Farquhar, E. R. & Marletta, M. A. (2014). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 13822–13827.
- Wang, T.-N. & Zhao, M. (2017). *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 685–696.
- Westereng, B., Ishida, T., Vaaje-Kolstad, G., Wu, M., Eijsink, V. G. H., Igarashi, K., Samejima, M., Ståhlberg, J., Horn, S. J. & Sandgren, M. (2011). *PLOS ONE* 6, e27807.
- Wu, D., Wei, Z., Mohamed, T. A., Zheng, G., Qu, F., Wang, F., Zhao, Y. & Song, C. (2022). *Chemosphere* 286, 131635.
- Xu, Q., Fu, Y., Gao, Y. & Qin, M. (2009). *Waste Management* 29, 1486–1490.
- Yao, G., Wu, R., Kan, Q., Gao, L., Liu, M., Yang, P., Du, J., Li, Z. & Qu, Y. (2016). *Biotechnol Biofuels* 9, 78.
- Yavuz, M., Kaya, G. & Aytekin, Ç. (2014). *International Biodeterioration & Biodegradation* 88, 199–205.
- Zelt, T. (2018). Vol. *Biokerosene: Status and Prospects*, edited by M. Kaltschmitt & U. Neuling. pp. 277–301. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Zerva, A., Pentari, C., Ferousi, C., Nikolaivits, E., Karnaouri, A. & Topakas, E. (2021). *Bioresource Technology* 342, 126058.

CAPÍTULO 2 - Expressão, extração e ensaios de atividades preliminares de uma nova lacase com características termofílicas e alcalinas de *Chitinophaga* sp.

RESUMO - Lacases (EC 1.10.3.2) são oxidoredutases que pertencem à subfamília das “multicopper oxidases”, classificadas entre amarelas/brancas ou azuis de acordo com seu espectro de absorção. Lacases amarelas são mais interessantes para processos industriais, uma vez que oxidam compostos não fenólicos na ausência de um mediador redox e se destacam por serem mais estáveis e funcionais em condições extremas. Este trabalho objetivou caracterizar uma nova lacase prospectada no genoma de *Chitinophaga* sp. CB10: Lac_CB10. A Lac_CB10, de massa molecular predita de 100,06 kDa foi purificada e caracterizada a partir de ensaios bioquímicos, utilizando guaiacol como substrato e demonstrou características extremófilas, exibindo atividade relativa em condições alcalinas (tampão CAPS pH 10,5) e termofílicas (80 – 90 °C), bem como manteve sua atividade acima de 50% por cinco h em condições de 80 e 90 °C. Além disso Lac_CB10 apresentou perfil espectral típico de lacases amarelas, exibindo somente um pico de absorbância em 300 nm (sítio T2/T3) e ausência do pico em 600 nm (sítio T1). Estes resultados sugerem que Lac_CB10 tem alto potencial para aplicações industriais e na biorremediação de ambientes contaminados, uma vez que esses processos geralmente ocorrem em temperaturas e pHs extremos.

1. INTRODUÇÃO

A função catalítica de algumas proteínas depende da presença de cobre como cofator. Um exemplo notável dessa categoria de enzimas são as multicobre oxidases (MCOs), uma superfamília de proteínas que desempenham um papel crucial na oxidação de seus substratos e na redução de oxigênio em água. As MCOs englobam diversas subclasses, incluindo as ascorbato oxidases (EC 1.10.3.3), bilirrubina oxidases (EC 1.3.3.5), ferroxidases (EC 1.16.3.1) e lacases (EC 1.10.3.2) (Gräff et al., 2020).

Dentre essas subclasses, as lacases são a maior subfamília, caracterizadas pelo seu sítio ativo composto por quatro átomos de cobre distribuídos em três centros diferentes. Esses centros, conhecidos como cobre tipo 1 (T1), cobre tipo 2 (T2) e cobre tipo 3 (T3), apresentam absorções em torno de 600 nm (T1) e 300 nm (T2/T3) e desempenham um papel fundamental em sua atividade catalítica (Bento et al., 2006).

A maioria das lacases exibe absorção em ambos os centros T1 (600 nm) e T2/T3 (300 nm), o que as classifica como lacases azuis (Komori e Higuchi, 2015). No entanto, algumas lacases apresentam apenas absorção em torno de 300 nm, correspondente aos centros T2/T3. Estas são referidas por alguns pesquisadores como lacases amarelas, enquanto outros as chamam de lacases brancas, sendo ambas as denominações aceitáveis para descrever essa característica espectral (Chaoua et al., 2023; Leontievsky et al., 1997).

A transição das lacases de azuis para amarelas permanece um fenômeno pouco compreendido, mas várias teorias foram propostas. Elas incluem mudanças nos níveis de oxidação (Radveikienė et al., 2021), diferenças estruturais (Mate et al., 2013) variações nos estados de glicosilação (Mot et al., 2020) e interações com íons metálicos (Radveikienė et al., 2021). Além das diferenças espectrais, as lacases amarelas destacam-se por sua capacidade de oxidar compostos não fenólicos na ausência de um mediador redox, bem como por sua notável estabilidade e funcionalidade em condições adversas (Leontievsky et al., 1997; Pozdnyakova et al., 2004).

As lacases são amplamente distribuídas em diferentes reinos, incluindo fungos, bactérias, plantas e insetos, e sua ampla especificidade de substrato as torna valiosas

em várias aplicações biotecnológicas. Essas aplicações incluem deslignificação, coloração, degradação e descoloração de corantes têxteis, biorremediação de xenobióticos e poluentes orgânicos, biobranqueamento, produção de biocombustíveis e biossensores (Radveikienė et al., 2021; Mate et al., 2013).

Embora a maioria das lacases seja de origem fúngica, estudos indicam que algumas lacases bacterianas apresentam um potencial ainda maior para aplicações industriais, devido à sua notável resistência a condições extremas, como alta temperatura e pH, além de sua rápida taxa de crescimento. Algumas lacases bacterianas notáveis incluem as de *Azospirillum lipoferum*, *Aquifex aeolicus* VF5, *Sinorhizobium meliloti*, *Bacillus tequilensis* SN4 e *Alcaligenes faecalis* (Givaudan et al., 1993; Deckert et al., 1998; Castro-Sowinski et al., 2002; Sondhi et al., 2015; Mehandia et al., 2020).

Considerando a importância de identificar novas lacases bacterianas com potencial industrial, este estudo apresenta uma nova lacase amarela isolada da *Chitinophaga* sp. CB10, que demonstrou atividade e estabilidade relevantes em altas temperaturas e pH alcalino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem da ORF codificadora da enzima Lac_CB10

A enzima lacase Lac_CB10 foi prospectada do genoma de *Chitinophaga* sp. CB10, uma bactéria gram-negativa que foi isolada de um consórcio proveniente de solo com alta taxa de degradação de biomassa, cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e carboximetilcelulose (CMC). Em um trabalho anterior o genoma deste microrganismo foi parcialmente sequenciado (Kishi et al., 2017) e está depositado sob o número de acesso MLAV000000000 no NCBI ("National Center for Biotechnology Information") Gen Bank, fazendo parte também da coleção interna de genomas e metagenomas do LBMP. O isolado bacteriano mostrou-se promissor para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, como por exemplo, lacases, que executam papel primordial junto a outras enzimas, como hemicelulases. As lacases estão

envolvidas na despolimerização de biomassa lignocelulósica, por atuar na lignina, diminuindo a recalcitrância do material. Sendo assim, foi realizada a prospecção *in silico* no genoma da *Chitinophaga* sp. CB10 para enzimas lacases, buscando por seus domínios conservados (Buzzo, 2019) e ensaios de expressão, extração e atividade enzimática.

2.2. Análise de domínios conservados e dendrograma fenético da lacase

A sequência foi submetida à análise na plataforma “online” Pfam (Mistry et al., 2021), que possibilita a identificação do número de domínios presentes na sequência, a determinação se esses domínios estão completos ou não, bem como a associação deles a grupos específicos. Essa análise foi conduzida com o propósito de identificar a presença de domínios conservados relacionados à família das MCOs.

O dendrograma fenético foi gerado pelo programa MEGA7 (Kumar et al., 2016) com base na matriz de distância obtida a partir de um alinhamento gerado pelo Editor de Alinhamento de Sequência BioEdit (Hall., 1999). O método de otimização por agrupamento de “neighbor-joining” foi utilizado, e foram realizadas 5000 replicatas de amostragem de inicialização, além de empregar o modelo de substituição de Poisson. A árvore foi editada com o programa FigTree (Rambaut., 2010).

Foram utilizadas cinco sequências de cada superfamília de MCO encontradas em bactérias: Bacterial CopA - H; Bacterial Bilirubin Oxidase - I; Bacterial Cueo - J; Bacterial COM - L; SLAC-like (type B) - K; Bacterial type B 2dMCO - N; e Archaeal and Bacterial type C - O. As sequências foram obtidas no banco de dados de lacases e MCOs no Biocatnet LccED v6.4 (Sirim et al., 2011; Gräff et al., 2020). O alinhamento para demonstrar os padrões conservados foi realizado usando o “software” Praline (Simossis e Heringa, 2005), com cinco sequências pertencentes à família CopA obtidas no banco de dados de lacases e MCOs no Biocatnet LccED v6.4 (Sirim et al., 2011; Gräff et al., 2020).

2.3. Clonagem do gene Lac_CB10

O gene Lac_CB10 possui 2.187 pares de bases e foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos lac-F1 (5'-TATGGATCCCCCAAACCGTTCGGTACGACCTC-3') e lac-R1 (5'-ATATAAGCTTAATAACTCAACGTAATAC-3'). O desenho dos primers foi realizado manualmente e sua qualidade foi avaliada por meio da ferramenta online PCR Primer Stats ("Sequence Manipulation Suits," www.bioinformatics.org), com objetivo de verificar a porcentagem de conteúdo GC, a temperatura de anelamento e a formação de estruturas secundárias.

Os parâmetros de ciclagem da PCR utilizados para amplificar o gene foram os seguintes: uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 seg, pareamento do primer a 60 °C por 45 seg, extensão do gene pela DNA polimerase a 68 °C por 2,5 min e, por fim, uma extensão de 30 min para a adenilação do gene. Os componentes utilizados na reação estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes utilizados na reação de PCR para amplificação do gene codificador de lacase

Componentes	Volume
Taq DNA polimerase Platinum™ 5U/ul – Sigma - Aldrich	0,5µL
Primer F (25,0 pmol) (Sigma)	2,0 µL
Primer R (25,0 pmol) (Sigma)	2,0 µL
Buffer 10x	5,0 µL
DNTP (10 mM)	0,5 µL
MgCl (25 mM)	1,5 µL
DNA total CB10 (100 ng/µL)	0,5 µL
Água ultrapura (q.s.p)	38,0 µL
Volume Final	50 µL

Os produtos da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), contendo brometo de etídio a uma concentração de 0,5 mg/μL. As imagens do gel foram documentadas por meio do Gel Doc 100, utilizando o “software” Image Lab version 6.0.1 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América).

Após a obtenção do fragmento alvo amplificado, ele foi purificado utilizando o “Kit Zymoclean Gel DNA Recovery” (Zymo Research)”, seguindo as recomendações do fabricante, e quantificado por meio do aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, o inserto foi submetido à reação de ligação ao vetor pET SUMO (Figura 1) utilizando a enzima DNA ligase T4, a uma temperatura de 15 °C, por um período de 16 h. Essa reação foi realizada com o kit Champion pET SUMO TA expression system, Invitrogen, USA.

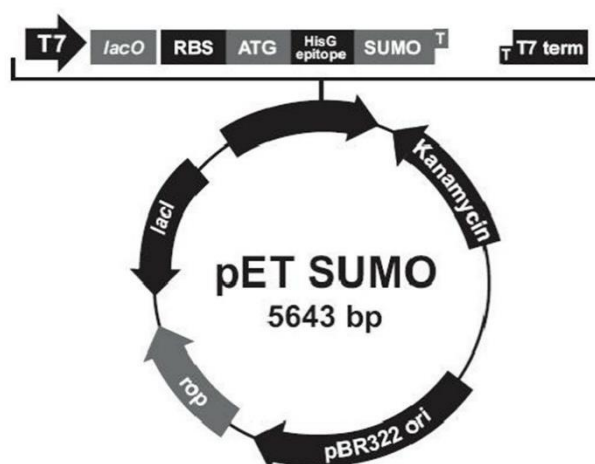


Figura 1. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO. Apresenta uma sequência codificadora de cauda de histidina no C-terminal; a sequência referente ao operon da lactose, *lacI*; o gene que confere resistência à canamicina; uma região com múltiplos sítios de clonagem e um modificador relacionado à ubiquitina (SUMO) que auxilia na solubilidade de proteínas recombinantes.

2.4. Transformação de células competentes com as construções obtidas

As células de *Escherichia coli* ER2265 quimicamente competentes foram transformadas com o vetor recombinante pETSUMO-LacCB10. Para tal, foram utilizados 50 μL de célula competente e 2 μL da ligação, que foram incubadas por 10

min no gelo, seguida por uma incubação a 42 °C por 90 segundos e novamente mantida em gelo por 2 min. Após o término da reação por choque térmico, foram adicionados 970 µL de meio SOC (kit Champion pET SUMO TA expression system) e mantidas sob agitação orbital de 200 rpm a 37 °C por 1 h e 30 min, a fim de propiciar o desenvolvimento das células transformadas. Após o término da incubação, foram aplicados 100 µL da cultura em placa de petri contendo meio Luria Bertani (LB) sólido (10 g/L de Triptona; 5 g/L de Extrato de Levedura; 10 g/L de NaCl; 10 g/L de ágar pH 7,0) com canamicina (50 µg/mL), e incubados novamente em B.O.D a 37 °C por 16 h.

Após as 16 h, metade de cada colônia isolada foi coletada com palito de dente estéril e submetidas a PCR de colônia para confirmação da clonagem. Para tal, os clones coletados foram depositados em microtubos contendo 15 µL de tampão de lise celular (KCl 50 mM, Tween 20 0,1% e Tris-HCl 10 mM, pH 8,3) e submetidos a uma temperatura de 100 °C por 5 min, seguido de centrifugação a 13.000 x g por 10 min e coletado 2 µL do sobrenadante para a reação de PCR, a mesma descrita anteriormente, e visualizados em gel de agarose 1%.

Após a confirmação da clonagem, a outra metade das colônias isoladas dos clones positivos foram inoculados em meio LB líquido contendo canamicina e incubados a 37 °C por 16 h. Após a incubação, alíquotas contendo 800 µl da cultura foram estocadas em microtubos com glicerol (20% v/v), submetidas a congelamento rápido por nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Além de confirmar a clonagem por meio de PCR de colônia, foi realizado sequenciamento do vetor recombinante pelo Sanger ABI 3130 XL (Applied Biosystems®) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando os “primers” de sequenciamento do vetor (“SUMO Forward Sequencing e T7 Reverse Sequencing”).

2.5. Ensaios de expressão da proteína recombinante

Para realizar os ensaios de expressão, um clone positivo da construção pETSUMO-LacCB10 foi retirado do estoque em glicerol e estriado em meio LB sólido suplementado com canamicina (50 µg/mL) e incubado a 37 °C por 16 h. Após a incubação, uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio LB líquido contendo

canamicina e submetido a agitação a 200 rpm por 16 h a 37 °C para preparo do pré-inóculo. Uma alíquota de 2 mL foi inoculada em 200 mL de meio LB líquido com canamicina, que permaneceu sob agitação a 200 rpm e 37 °C até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. Após atingir a fase logarítmica de crescimento, foram testadas diferentes concentrações de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (0,3 mM; 0,6 mM e 0,9 mM) para indução da expressão, e foram deixadas sob agitação por 24 h a 28 °C a 200 rpm, com alíquotas (2 mL) sendo coletadas a cada duas h durante as 10 h iniciais e a última alíquota coletada em 24 h, bem como uma alíquota para controle anterior à adição do IPTG. As alíquotas foram centrifugadas a 6400 x g por 5 min, o sobrenadante descartado e o “pellet” lisado com tampão de lise (fosfato de potássio 50 mM; lisozima 250 μ g/mL, pH 7.8), ambos analisados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 7% para avaliar a melhor condição de expressão.

Uma outra construção da lacase, clonada em pET28a+ (pET28a-LacCB10), foi inserida em outras cepas de *E. coli* através de transformação por choque térmico. As cepas avaliadas foram Lemo21 (DE3) (expressa com 0, 250, 500 e 1000 μ M de ramnose) (NEB, Ipswich, Massachusetts, EUA); Rosetta (DE3) (Novagen), C43 (DE3), WK6 e plysS. Também foram realizados ensaios de expressão em diferentes temperaturas (15, 30 e 37 °C) com 1 mM de IPTG, em meio LB e meio mineral M9, com o intuito de avaliar a expressão da proteína em diferentes meios de cultura.

Após os ensaios de expressão serem analisados e a melhor condição ser determinada para expressão em maior escala, a cultura foi centrifugada a 1700 x g por 30 min a 4 °C e o “pellet” armazenado a -20 °C.

2.6. Extração e purificação da enzima Lac_CB10

A cultura contendo a construção pETSUMO-LacCB10 foi centrifugada a 6400 x g (Sorvall RC5C; Kendro Lab Products, Ashville, NC, USA), 4 °C por 30 min, e o “pellet” foi ressuspensionado em tampão de extração 1 (Tabela 2). As células foram rompidas por ultrasonicação (Branson Sonifier 250, Branson, Connecticut, USA), com razão cíclica de 20% com 12 ciclos de 15 pulsos e intervalos de 15 segundos. As células rompidas foram centrifugadas por 20 min a 6400 x g a 4 °C e o sobrenadante coletado, sendo chamado de 1º extrato, e o “pellet” foi novamente ressuspensionado em tampão de

extração 1 e sonificado. A amostra sonificada foi centrifugada nas mesmas condições citadas e o sobrenadante foi coletado, chamado de 2º extrato e uma alíquota do “pellet” foi ressuspensionado em tampão para visualização em gel.

Tabela 2. Composição e concentração do tampão utilizado durante a extração

Composição		
Tampão de extração 1	Fosfato de potássio pH 7,8	50 mM
	KCl	100 mM
	NaCl	400 mM
	Glicerol	10%
	Triton x-100	0,5%
	PMSF	3 mM
Tampão de extração 2	Fosfato de potássio pH 7,0	200 mM
	NaCl	200 mM
	Glicerol	10%
	Imidazol	20 mM

As células transformadas com a construção pET28a-LacCB10 também foram cultivadas e centrifugadas a 6400 x g (Sorvall RC5C; Kendro Lab Products, Ashville, NC, USA), 4 °C por 30 min, e o “pellet” foi ressuspensionado em tampão de extração 2 (Tabela 2). As células foram rompidas por ultrasonicação seguindo os mesmos parâmetros acima, centrifugadas por 20 min a 6400 x g a 4 °C e o “pellet” equivalente foi ressuspensionado em tampão de extração 2 (com uma proporção de 10 mL de tampão por litro de cultura), conforme indicado na Tabela 2, juntamente com 2 mg de lisozima e incubado por 1 h sem agitação e em banho de gelo. Após o tempo de incubação, a célula ressuspensionada foi submetida à sonicação por 10 min com pausas de 20 em 20 segundos. A seguir, a amostra foi centrifugada a 6400 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi então coletado e chamado de 1º extrato e o “pellet” foi ressuspensionado novamente em 5 mL do tampão de extração e novamente sonificado. A amostra sonificada foi centrifugada nas mesmas condições citadas e o sobrenadante foi

coletado, chamado de 2º extrato e uma alíquota do “pellet” foi ressuspendido em tampão para visualização em gel.

Foi feita também extração enzimática das duas construções utilizando tampão B-PER™ “Bacterial Protein Extraction Reagent” (Thermo Scientific). Este reagente é um tampão fosfato, não iônico à base de detergente que ocasiona a lise celular e solubilização de proteínas nativas ou recombinantes sem ser necessário realizar a desnaturação. A extração foi feita seguindo as recomendações do fabricante, onde 4 mL do reagente foi adicionado para cada grama de célula, seguido de incubação por 15 min à temperatura ambiente e centrifugação a 15.000 x g por 5 min para a separação de proteínas solúveis e insolúveis.

Após a extração, os extratos solúveis foram incubados por 1 h a 4 °C sob agitação com 3,5 mL de Ni²⁺ - Resina NTA (Qiagen, Hilden, Alemanha), previamente equilibrada com o mesmo tampão 2, utilizado na etapa de extração enzimática. Após esta incubação, a amostra composta pela resina e extrato ligado foi submetida a um gradiente de imidazol de 10 mM a 1 M. A proteína de interesse foi eluída usando o mesmo tampão de extração contendo imidazol 500 mM.

A proteína recombinante foi concentrada usando um filtro Amicon Ultra-15 MWCO 10 kDa (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) e submetida a cromatografia adicional para remover contaminantes e estimar o peso molecular e estado oligomérico destes compostos. A cromatografia de exclusão molecular foi conduzida usando ÄKTA Pure (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) e coluna HiloLoad 16/600 200 Superdex (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min, injeção de 2 mL e pressão de 0,42 mPa. Os parâmetros de fluxo, injeção e fracionamento foram controlados usando o software UNICORN 5.0 (Amersham Bioscience Co., Piscataway, NJ).

2.7. Ligação ao cobre e determinação da concentração de enzima

A proteína recombinante purificada foi incubada com CuSO₄ 1 mM por 6 h para permitir o preenchimento dos sítios de ligação do cobre e, assim, a criação da holoenzima ativa ligada ao seu cofator (cobre). Após a incubação, o excesso de cobre foi removido usando tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8 suplementado com

ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) 1 mM, seguido de cinco lavagens adicionais com o mesmo tampão sem EDTA de acordo com o protocolo modificado de (Machczynski et al., 2004). As lavagens foram concluídas usando dispositivo de filtração Amicon Ultra-15 MWCO 10 kDa (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). A concentração de proteína foi estimada usando o ensaio de Bradford com albumina de soro bovino como padrão a 595 nm (Bradford, 1976).

2.8. Análise de UV-Visível

O espectro de UV-Vis foi aferido para amostras de holoenzima e apoenzima de Lac_CB10, empregando a faixa de leitura espectrofotométrica de 200-900 nm com intervalo de 5 nm, utilizando o espectrofotômetro UV-vis Multiscan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 205 USA). O espectros de absorção dos centros de cobre de Lac_CB10 foram comparados com uma lacase caracterizada como azul (Lima et al., 2022).

2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), “Western Blotting” e zimograma

A eletroforese foi realizada com tampão Tris-glicina [50 mM de Tris-HCl; 150 mM de Glicina e 0,1% de SDS (p/v)]. O gel foi corado tanto com “Coomassie Brilliant Blue” [40% de metanol (v/v); 10% de ácido acético glacial (v/v) e Coomassie R-250 a 0,1% (p/v)] e descorado em solução contendo 10 % de ácido acético (v/v), tanto com nitrato de prata 0,2% (Laemmli, 1970). A enzima também foi submetida a análise de “Western Blotting”, onde o gel de poliacrilamida SDS 7% contendo a amostra da enzima foi transferido para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF, Thermo Fisher Scientific) com porosidade de 0,45 µm usando Mini Trans-Blotting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) em tampão CAPS 10 mM pH 11,0 contendo 10% de metanol a 90 V por 45 min a 4 °C. Os locais inespecíficos foram bloqueados com solução salina tamponada com fosfato (PBS), Tween 20 (0,02% v/v) e leite em pó desnatado (Molico) a 5% (diluição 1: 1.000). A membrana foi incubada com o

anticorpo monoclonal anti-poli-histidina (H1029, Sigma, Saint Louis, MO) e com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-IgG de camundongo (A9044, Sigma, Saint Louis, MO). A revelação foi realizada na presença de tetracloreto de 3,3'-diaminobenzidina em 15 mL de água ultrapura contendo 12 µL de H₂O₂ a 30% (Yang e Mahmood, 2012).

O teste de zimograma foi feito para avaliar a atividade da lacase. As bandas proteicas foram separadas usando um ensaio eletroforético não desnaturante (PAGE 7%) a 4 °C e 100 V e, em seguida, incubadas na presença do substrato catecol (10 mM) e guaiacol (0,02%) em tampão CAPS pH 10,5.

2.10. Determinação da atividade da Lac_CB10

A atividade da lacase foi determinada pela leitura dos valores de absorbância obtidos após a oxidação do substrato guaiacol (420 nm). As reações foram realizadas em microplacas com um volume total de 100 µL, sendo 20 µL de tampão (20 mM), 1,24 µL de substrato (1 mM) e 10 µL (35,82 µg/µL) da enzima. O efeito do pH foi avaliado na faixa de 3,0-12,0 utilizando os seguintes tampões: Acetato de Sódio (pH 3, 4,0, 5,0, 5,5 e 6,0); MES (pH 5,5, 6,0, 6,5); PIPES (pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5); MOPS (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0); HEPES (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0); Tris-HCl (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5); TAPS (pH 8,0, 9,0); Ampol (pH 9,0, 9,5 e 10,0); CAPS (9,5, 10,0, 10,5, 11,0); Glicina (pH 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5); Bicarbonato de sódio (pH 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 12,0) e Fosfato de potássio (pH 11,0, 11,5, 12,0).

O ensaio de temperatura ótima foi realizado no melhor pH indicado no teste anterior e avaliado nas temperaturas de 10, 15, 25, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C por uma hora. A termoestabilidade foi avaliada incubando previamente a enzima por cinco horas, nas temperaturas de 80 e 90 °C, onde a cada 30 min uma alíquota de 10 µL era retirada e adicionada em uma reação contendo o tampão com pH ideal e o substrato guaiacol e submetidos a reação na temperatura ótima indicada no teste anterior.

A atividade também foi avaliada em relação a tolerância da enzima na presença de detergentes, sendo SDS, Triton x-100 e Tween 80, nas concentrações de 0,5 e 1% (v/v), EDTA e DTT nas concentrações de 1 mM, 5 mM e 10 mM. A tolerância de

solventes foi analisada com metanol e acetona, ambos nas concentrações de 1, 2 e 5% (v/v) e o efeito dos sais e íons metálicos foram avaliados com CuSO₄, MgSO₄, NiCl₂, CaCl₂, NaCl₂, CoCl₂, KCl, FeSO₄, MnSO₄, Al₂(SO₄)₃, Li₂SO₄, AgNO₃, BaCl₂, ZnSO₄, CdCl₂ e KI a 2 mM, seguindo os parâmetros ótimos de pH e temperatura.

2.11. Degradação de Lignina pela Lac_CB10

Os ensaios foram realizados utilizando células de *E. coli* contendo Lac_CB10. Um pré-inóculo foi preparado conforme detalhado na seção 2.4 e, em seguida, adicionado a frascos contendo 0,4 mg/mL de lignina alcalina (AL) e meio LB. O ensaio prosseguiu por 36 h sob agitação a 150 rpm e temperatura de 55 °C. Dois tratamentos foram realizados: um sem qualquer indutor, consistindo apenas nas células transformadas, e outro com cobre (0,25 mM) como indutor. O cálculo de degradação foi realizado como descrito por (Khan et al., 2024):

$$\text{Degradação (\%)} = (A_i - A_f) \times 100$$

Onde A_i é a absorbância inicial e A_f a absorbância final

2.12. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) da Degradação de Lignina

Os dois tratamentos de lignina, com e sem indutor, foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (ZEISS EVO MA10) para verificar possíveis mudanças estruturais na lignina. As amostras foram primeiramente liofilizadas e, em seguida, montadas em fita de carbono. Adicionalmente, elas foram revestidas com ouro para facilitar a visualização e a obtenção de imagens.

2.13. Análise estatística

Todos os experimentos realizados nesse trabalho foram realizados com réplicas estatísticas (triplicatas). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) com teste de comparações múltiplas de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Clonagem do gene Lac_CB10

A fase de leitura aberta (ORF) do gene codificador da lacase Lac_CB10 consiste em 2184 nucleotídeos, que codifica uma proteína de 728 aminoácidos com massa molecular predita de 84 kDa. O gene foi amplificado através de reações de PCR (Figura 2A), clonado no vetor de expressão pETSUMO (pETSUMO-LacCB10) e transformado em células competentes de *E.coli* ER2265, onde foram obtidos 13 clones, sendo 11 positivos, confirmados por PCR de colônia (Figura 2B).

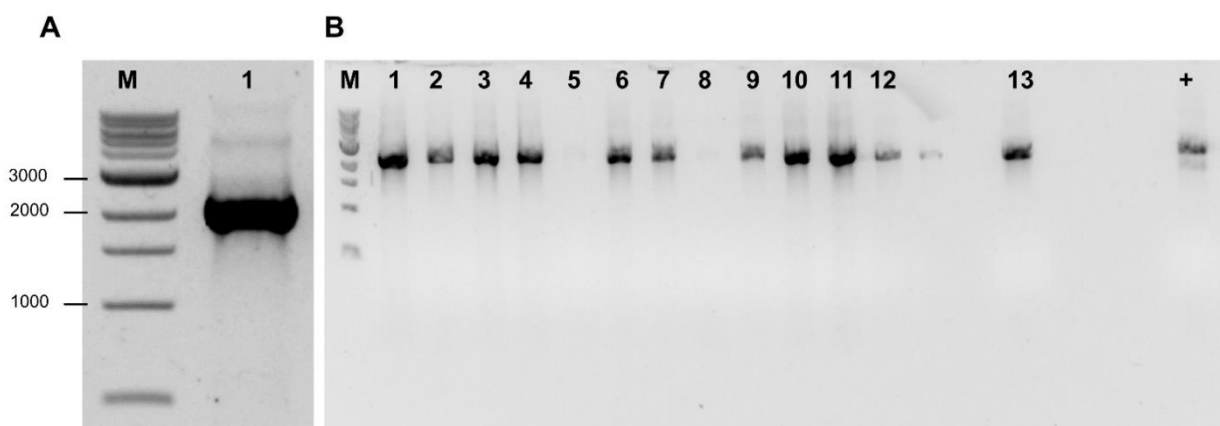


Figura 2. A. Eletroferograma do fragmento de interesse a partir do DNA genômico de *Chitinophaga* sp. CB10. A canaleta M contém o marcador de tamanho molecular e a canaleta um a confirmação da amplificação do gene Lac_CB10. B. Eletroferograma da amplificação dos clones por PCR de colônia para confirmação da clonagem. As canaletas 1,2,3,4,6,7,9,10,11,12 e 13 indicam os clones positivos, e a canaleta com símbolo “mais” indica o controle positivo.

Os clones positivos passaram por extração plasmidial e quantificação (Tabela 2) antes de serem sequenciados para confirmar a inserção correta do fragmento no vetor pETSUMO. Isso confirmou que o DNA recombinante foi inserido adequadamente nos clones, mantendo a mesma “frame” (janela) de leitura do promotor e a mesma orientação deste.

Tabela 2. Quantificação da extração plasmidial dos clones positivos obtidos com a construção pETSUMO-LacCB10

Clone	ng/ μ L
1	108,7
2	115,0
3	98,8
4	119,3
6	131,5
7	126,5
9	153,7
10	108,0
11	101,4
12	113,4
13	123,9

3.2. Expressão e extração enzimática

Embora avaliados diferentes linhagens de *E.coli* (BL21(DE3), Rosetta (DE3), WK6, C43 (DE3) e BL21 (DE3) pLysS, diferentes vetores de expressão (pET28a+), condições de temperatura (de 15 a 37 °C), concentrações de indutor (0,3 a 1 mM) e diferentes tipos de meio de cultivo (M9 e autoindução), observou-se que a proteína não apresentou uma expressão significativa em nenhum dos meios quando cultivada a 15 °C. No entanto, a 30 °C, durante um período de quatro horas, a expressão foi observada. Foi realizada uma tentativa de extração nativa em ambas as temperaturas e meios de cultura, mas a proteína permaneceu nos corpos de inclusão, com exceção

do cultivo a 30 °C (Figura 3A e 3B). Nesse caso, a proteína foi submetida a uma tentativa de purificação por troca iônica, mas sem sucesso (Figura 3C).

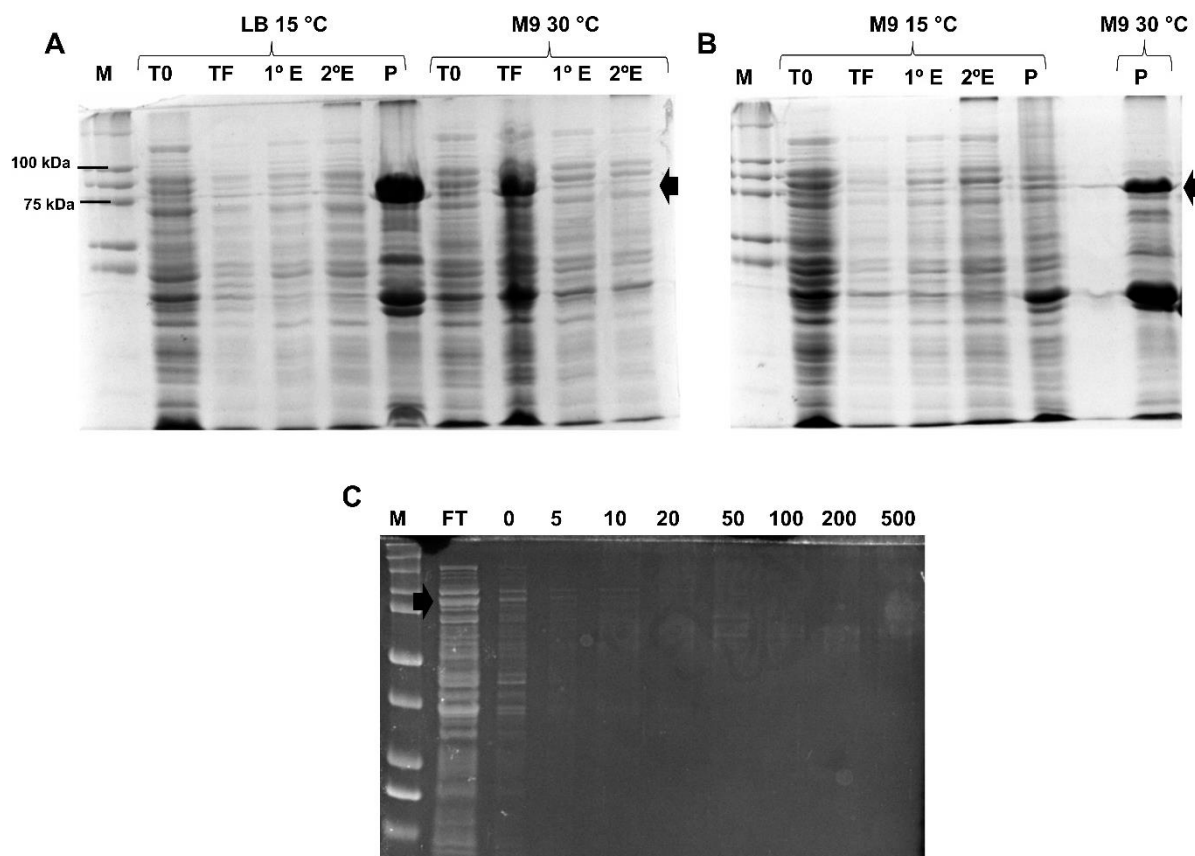


Figura 3. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 7%) revelando a expressão, extração e purificação da construção pET28a-LacCB10 em BL21 (DE3) expressa a 15 °C e 30 °C em meio mínimo (M9) e meio LB. A e B: Ensaios de expressão e extração com os meios LB e M9. (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad), (T0) - Extrato celular sem indução, (TF) - Extrato celular após 24 h de indução com 0,1 mM de IPTG, (1° E) - 1° extrato da extração, (2° E) - 2° extrato da extração, (P) - Fração insolúvel ("pellet") da extração. C: Ensaios de purificação. (FT) - Proteínas não ligadas na coluna de Ni-NTA – "Flow Through", (0 a 500) - Proteínas eluídas nas diferentes concentrações de imidazol, com 0 mM até 500 mM

Os resultados da extração nativa nas outras duas cepas (C43 e pLysS) revelaram que a proteína permaneceu agregada nos corpos de inclusão (dados não apresentados). Estas linhagens de *E. coli* utilizadas são conhecidas por serem adequadas para expressão de proteínas potencialmente tóxicas, sendo a pLysS

caracterizada por conter um plasmídeo que auxilia na redução dos níveis de expressão basal do gene de interesse.

Além disso, a extração nativa foi avaliada em outras cepas, como WK6, Rosetta e BL21 (DE3). As amostras escolhidas para a extração foram obtidas das células de *E. coli* BL21 (DE3), induzidas com 0,3 mM de IPTG por quatro (T4) e seis horas (T6), assim como daquelas induzidas com 0,6 mM de IPTG por seis horas (T6). Também foram analisadas amostras de células da cepa Rosetta, induzidas com 0,3 mM de IPTG por seis (T6) e oito horas (T8), 0,6 mM de IPTG por quatro horas (T4) e 1 mM de IPTG por seis horas (T6).

A cepa Rosetta (DE3) é especialmente otimizada para a expressão de proteínas que contêm códons raros para a *E. coli* hospedeira. Isso é viável graças à presença de um plasmídeo que codifica os códons AGG/AGA (arginina), CGG (arginina), AUA (isoleucina), CUA (leucina), CCC (prolina) e GGA (glicina).

Como ilustrado na Figura 4, as amostras induzidas com a menor concentração de IPTG por seis h, em ambas as cepas, exibiram bandas correspondentes à enzima (100 kDa) Lac_CB10, conforme esperado. Em vista desses resultados, foram conduzidos ensaios de expressão em maior escala (utilizando 200 mL de meio) para permitir a extração utilizando o tampão B-PER e tampão fosfato de potássio.

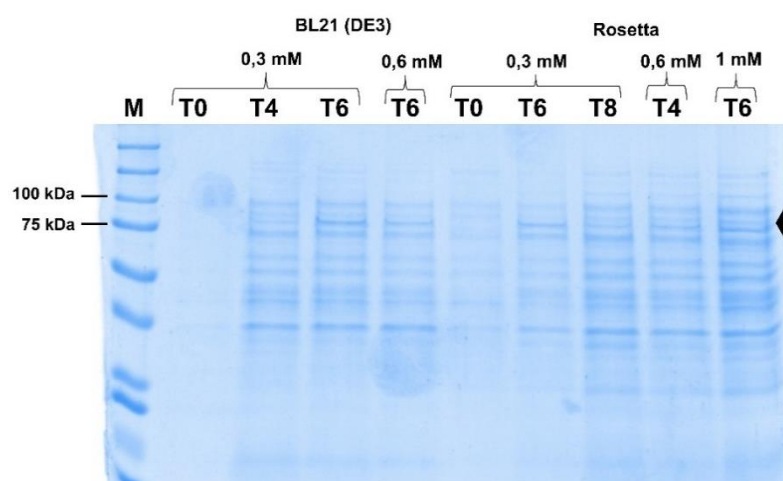


Figura 4. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 7%) revelando a lise celular da construção LacCB10-pET28a em BL21 (DE3) e Rosetta em diferentes concentrações de IPTG. Canaletas: (M) Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (T0) Extrato celular sem indução; (T4) Extrato celular após quatro h de indução; (T6) Extrato celular após seis h de indução; (T8) Extrato celular após oito h de indução.

Com o intuito de extrair a proteína na fração solúvel, utilizou-se o tampão B-PER, uma vez que todos os ensaios de extração, tanto neste estudo quanto em trabalho anterior com a construção pET28a-LacCB10, demonstraram que a proteína tende a permanecer nos corpos de inclusão. Nesse contexto, uma cultura de 200 mL foi dividida em duas partes iguais. Para uma delas, 100 mL foram submetidos à extração com o tampão B-PER, seguindo as instruções do fabricante. Para a outra metade, os 100 mL restantes foram extraídos utilizando o tampão de extração 2, cuja composição é detalhada na Tabela 2.

A análise do gel apresentado na Figura 5 revela que a extração realizada com o tampão B-PER não resultou na presença de proteína nos corpos de inclusão em ambas as amostras celulares. Em contrapartida, a extração com o tampão de extração 2 demonstrou a presença de proteína nos corpos de inclusão em ambas as amostras, porém também mostrou bandas na altura esperada para Lac_CB10.

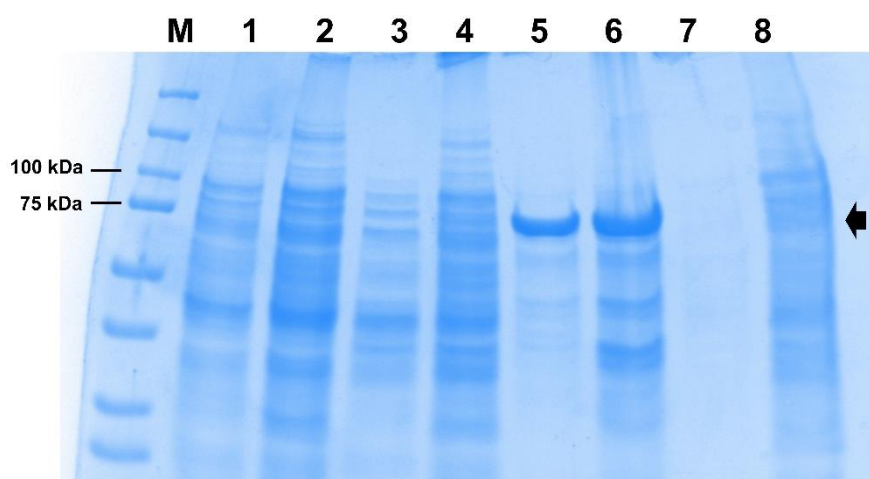


Figura 5. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 12%) revelando a extração da construção LacCB10-pET28 em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) e Rosetta a 28 °C com 0,3mM de IPTG. (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (1) - Extrato da fração solúvel de *E. coli* BL21(DE3) com tampão de extração 2; (2) - Extrato da fração solúvel de *E. coli* Rosetta com tampão de extração 2; (3) - Extrato da fração solúvel de *E. coli* BL21(DE3) com tampão B-PER; (4) - Extrato da fração solúvel de *E. coli* rosetta com tampão B-PER; (5) - Extrato da fração insolúvel ("pellet") de *E. coli* BL21(DE3) com tampão de extração 2; (6) - Extrato da fração insolúvel ("pellet") de *E. coli* rosetta com tampão de extração 2; (7) - Extrato da fração insolúvel ("pellet") de *E. coli* BL21(DE3) com tampão B-PER; (8) - Extrato da fração insolúvel ("pellet") de *E. coli* rosetta com tampão B-PER.

Diante desses resultados, ambas as amostras seguiram para o passo de purificação e para confirmar se realmente a enzima foi extraída na fração solúvel e purificada, foi feita uma análise de “Western Blotting” (Figura 6), mostrando que, em ambas as cepas, a lacase estava retida nos corpos de inclusão, e conseqüentemente, não houve sucesso na purificação.

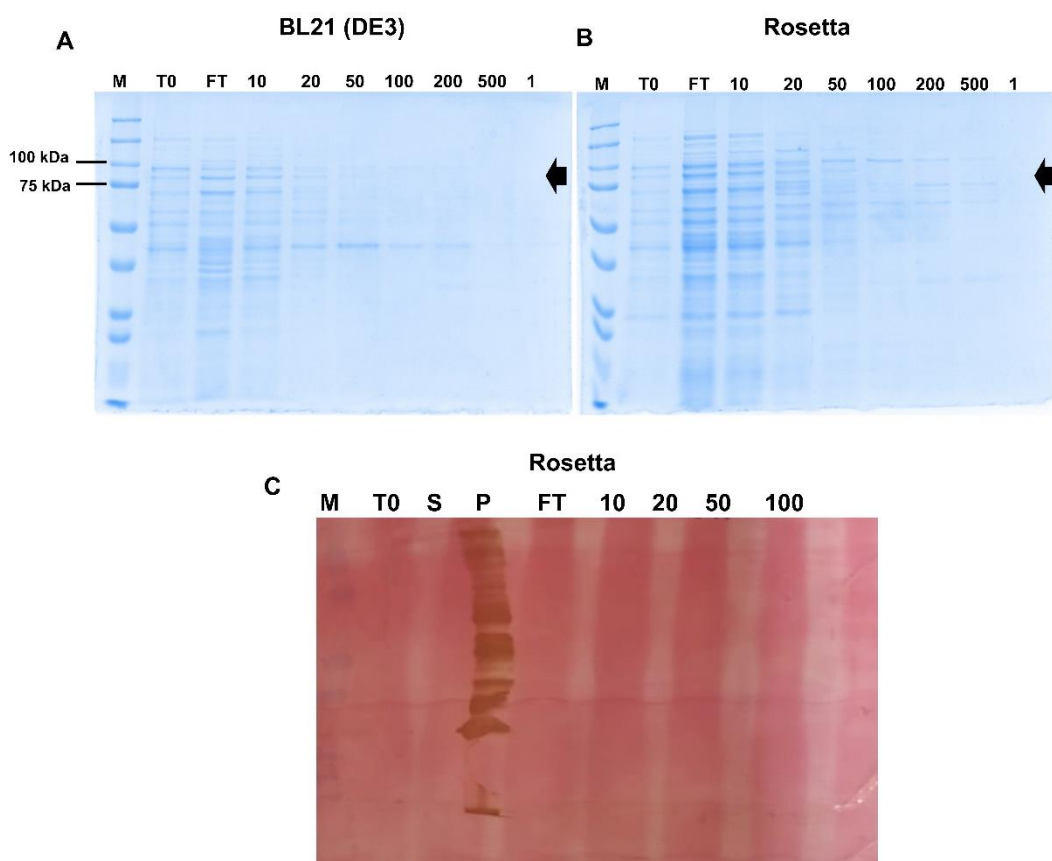


Figura 6. A e B: SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 7%) revelando a purificação da construção LacCB10-pET28a em BL21 (DE3) e Rosetta. (T0) - Extrato celular sem indução; (FT) - Proteínas não ligadas na coluna de Ni-NTA – “Flow Through”; (10 mM a 1 M) - Proteínas eluídas nas diferentes concentrações de imidazol, com 10 mM até 1 M. C: Análise da extração e purificação pelo método de Western Blotting. (S) - Fração solúvel da extração (sobrenadante); (P) Fração insolúvel da extração (“pellet”).

Todos os 11 clones positivos obtidos com a construção pETSUMO-LacCB10 foram expressos a 28 °C por 6 h e induzidos com 0,9 mM de IPTG. Em seguida, foi realizada a extração dessas amostras para avaliar se a enzima Lac_CB10 estava presente na fração solúvel de pelo menos um dos clones, a fim de selecionar um para expressão em maior escala. Essas amostras foram submetidas à análise em

gel de SDS-PAGE e “Western Blotting”. No entanto, apenas dois clones apresentaram uma banda no sobrenadante (dados não apresentados).

Um destes clones foi selecionado para uma expressão mais detalhada a 28 °C por 24 h, utilizando três concentrações diferentes de IPTG: 0,3 mM, 0,6 mM e 0,9 mM. Alíquotas (2 mL) foram coletadas a cada duas h durante as primeiras 10 h e, finalmente, após 24 h. Essas amostras foram submetidas a uma lise celular utilizando um tampão fosfato com pH 7,8, a fim de comparar os extratos solúveis (sobrenadante) e insolúveis (“pellet”) antes e depois da indução.

Conforme evidenciado na Figura 7, a enzima permaneceu retida nos corpos de inclusão em todos os tempos e concentrações de IPTG testados. No entanto, é possível observar bandas na fração solúvel correspondentes à Lac_CB10. Para confirmar se essas bandas realmente pertenciam à enzima ou se eram provenientes de *E. coli* ER2265, foi realizado um “Western Blotting” (Figura 8). Os resultados confirmaram que, mesmo com uma fração retida no “pellet,” a lacase foi extraída na fração solúvel quando expressa com 0,9 mM de IPTG por quatro horas. Essas condições foram, portanto, determinadas como as melhores para superexpressão e extração da proteína.

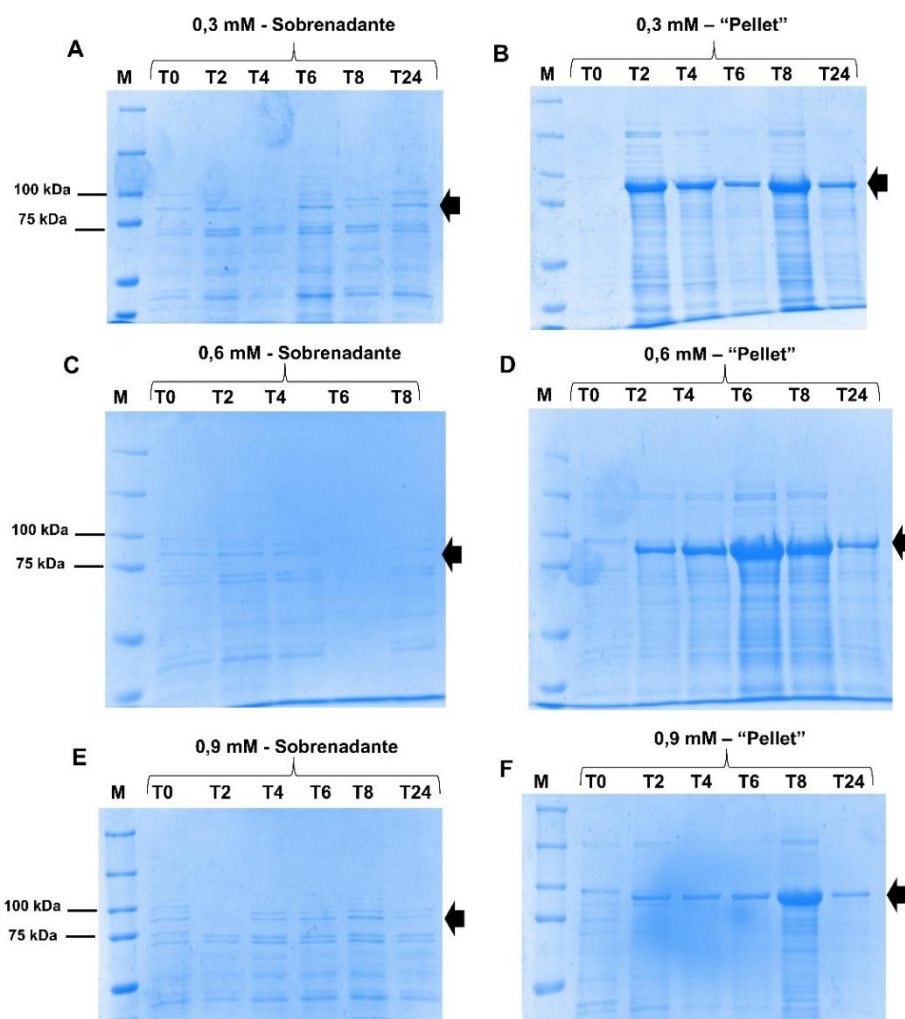


Figura 7. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 7%) revelando a lise celular da construção pETSUMO-LacCB10 em célula competente de *E.coli* ER2265. (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (T0) - Extrato celular sem indução; (T2) - Extrato celular com duas h de indução; (T4) - Extrato celular com quatro h de indução; (T6) - Extrato celular com seis h de indução; (T8) - Extrato celular com oito h de indução; (T24) - Extrato celular com 24 h de indução.

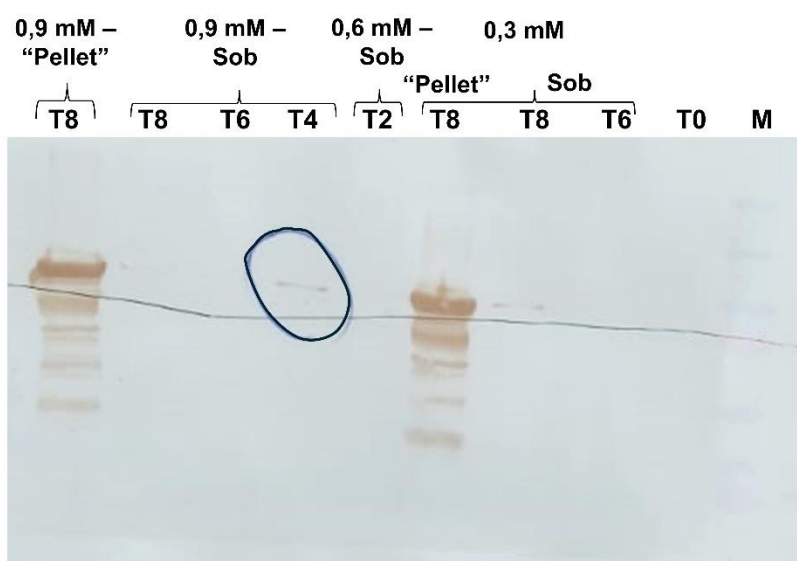


Figura 8. Análise por “Western Blotting” da lise celular da construção pETSUMO-LacCB10 em célula competente de *E.coli* ER2265. (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (T0) - Extrato celular sem indução; (T2) - Extrato celular com duas h de indução; (T4) - Extrato celular com quatro h de indução; (T6) - Extrato celular com seis h de indução; (T8) - Extrato celular com oito h de indução.

Após a otimização das condições de expressão, foi realizada a superexpressão em um litro de meio LB, utilizando os mesmos parâmetros previamente descritos. A cultura bacteriana foi dividida em dois frascos de 500 mL, posteriormente centrifugados para obter o “pellet”. Em seguida, a extração foi feita utilizando os tampões de extração 1 e o tampão B-PER.

Como pode ser observado na Figura 9, o tampão B-PER mostrou-se ineficaz na obtenção da proteína na fração solúvel. No entanto, ao utilizar o tampão de extração 1, foi possível obter a Lac_CB10 na fração solúvel no segundo extrato.

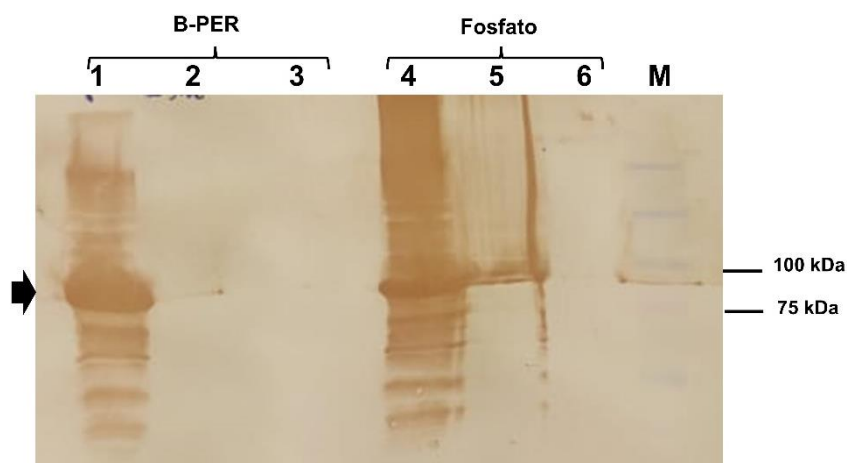


Figura 9. Análise por “Western Blotting” da extração celular com tampão B-PER e tampão fosfato de potássio 50mM pH 7.8 da construção pETSUMO-LacCB10 em célula competente de *E.coli* ER2265. (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (1 e 4) - Fração insolúvel (pellet) da extração; (2 e 5) - 1º extrato da fração solúvel; (3 e 6) - 2º extrato da fração solúvel.

Em seguida, o segundo extrato da fração solúvel passou por um processo de purificação, utilizando cromatografia de afinidade ao níquel e exclusão de tamanho no sistema ÄKTA Pure. No entanto, ao realizar a purificação no sistema Äkta Pure, houve uma perda constante da enzima Lac_CB10, sendo assim, a purificação foi realizada somente por afinidade ao níquel, onde a enzima foi eluída em um tampão contendo 500 mM de imidazol. Em seguida, a amostra foi concentrada utilizando um concentrador Amicon 30 kDa até atingir um volume final de 3 mL e, posteriormente, submetida à coluna PD-10 "Desalting Column" de 2,5 mL da Amersham Bioscience, seguindo as instruções do fabricante, para remover o excesso de sal presente no imidazol.

Na Figura 10A é possível observar o resultado da purificação da enzima Lac_CB10 por meio de gel SDS-PAGE 7%, que permitiu visualizar uma única banda purificada com uma massa molecular aproximada de 94 kDa. Essa massa é compatível com a massa prevista pelo programa Protparam, referente à proteína de fusão. Além disso, no “Western Blotting” (Figura 10B), foi possível confirmar que, após a eluição em um tampão livre de imidazol na coluna PD-10, a proteína foi recuperada.

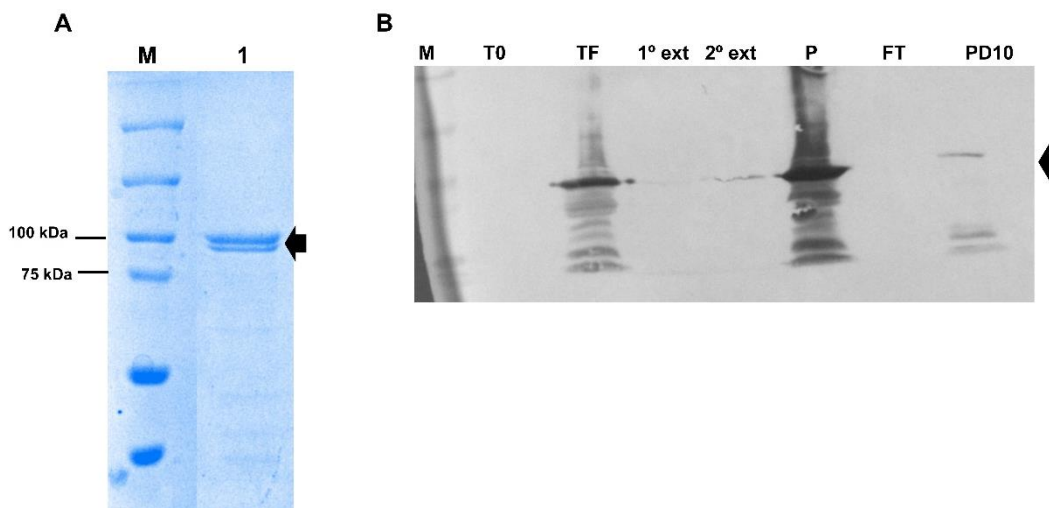


Figura 10. A: SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 7%) revelando a extração e purificação da Lac_CB10. B: “Western Blotting” revelando a extração e purificação da Lac_CB10. (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (1) - Proteína eluída com 500 mM de imidazol; (T0) - Extrato celular sem indução; (TF) - Extrato celular após seis h de indução; (1° Ext) - 1° extrato da extração; (2° Ext) - 2° extrato da extração, (P) - Fração insolúvel (pellet) da extração. (FT) - Proteínas não ligadas na coluna de Ni-NTA – “Flow Through”

As condições de expressão otimizadas de 28 °C a 200 rpm por quatro horas resultaram em um rendimento enzimático de 10,92 mg para cada litro de cultura e a cromatografia de exclusão de massa molecular foi usada para prever a massa da proteína Lac_CB10 em sua configuração de apoenzima nativa, através da análise de regressão linear da razão do volume de eluição vazio da coluna e o logaritmo da massa molecular no mesmo volume de eluição (V_e/V_o) obtido para amostras de um padrão comercial de peso molecular. A massa molecular estimada foi de 100 kDa (Figura 11).

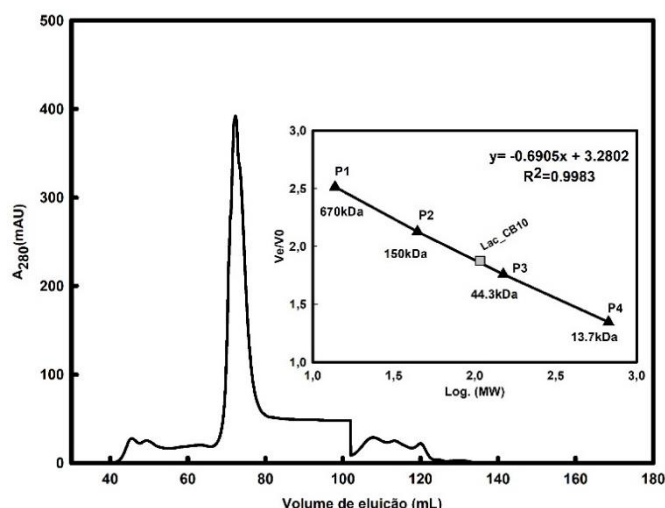


Figura 11. Perfil cromatográfico da lacase purificada por filtração em gel. Estimativa de massa molecular de Lac_CB10 por filtração em gel baseada na correlação linear. Eluição da massa molecular padrão de Lac_CB10 e padrões de proteína versus seus valores logarítmicos de massa molecular. P1–P4: Proteínas usadas como padrões de massa molecular: ácido p-aminobenzóico (pABA) (0,13 kDa), ribonuclease A (13,7 kDa), albumina (43 kDa), (tireoglobulina bovina (670 kDa), γ -globulina (150 kDa), Protein Standard Mix 15 ± 600 kDa, Sigma, St. Louis, MO, EUA).

Considerando a busca pelos resultados mais favoráveis na purificação da proteína Lac_CB10, foi feita a caracterização bioquímica desta lacase.

3.3. Predição funcional *in silico* e atividade em zimograma

MCOs são caracterizadas pela presença de dois ou três domínios de cupredoxina. Esses domínios são fundamentais para o desempenho catalítico da enzima, pois contêm os resíduos de histidina e cisteína altamente conservados que coordenam átomos de cobre (Makwana e Mahalakshmi, 2015), além do sítio de ligação entre substrato e enzima (Pardo et al., 2016). De acordo com o “Laccase and Multicopper Oxidase Engineering Database” (LccED) (Gräff et al., 2020; Sirim et al., 2011), as MCOs são agrupadas em 105 famílias homólogas e 16 superfamílias, das quais 11 contêm enzimas com três domínios de cupredoxina, e apenas 1 superfamília está associada a seis domínios. Das 16 superfamílias, oito são principalmente de organismos eucarióticos, incluindo fungos, plantas e insetos; sete são de bactérias; e apenas uma superfamília, composta por dois domínios, pertence às arqueias.

Para confirmar a homologia de Lac_CB10 com o grupo de MCOs, a sequência de proteína prevista para esta ORF foi submetida a uma análise de domínios conservados para identificar domínios de cupredoxina usando a plataforma Pfam (Mistry et al., 2021). Os resultados indicaram a presença de três domínios de cupredoxina, "Cu-oxidase 3", "Cu-oxidase" e "Cu-oxidase 2" (Figura 12), compostos por 107, 81 e 112 aminoácidos, respectivamente.

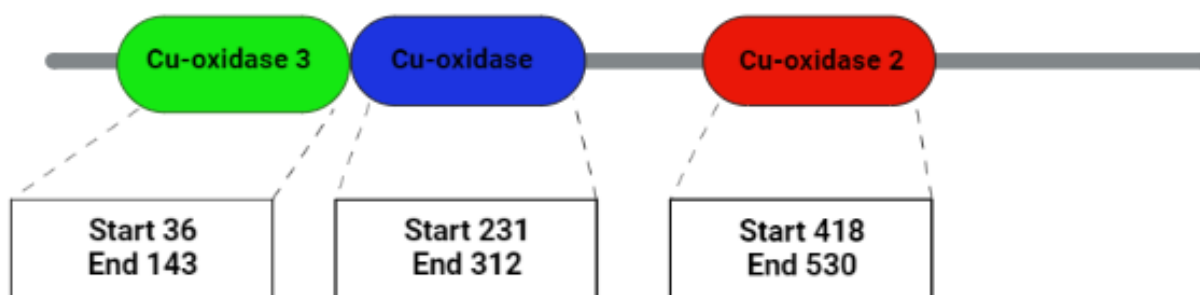


Figura 12. Esquema dos domínios Cu-oxidase 3, Cu-oxidase e Cu-oxidase 2 pertencentes a Lac_CB10, mostrando os números dos aminoácidos nos quais o domínio começa (início) e termina (fim) (Buzzo et al., 2023).

Para determinar a superfamília à qual Lac_CB10 deveria ser associada com base em uma matriz de distância, uma árvore filogenética foi construída através do método "neighbor-joining". Esta árvore utilizou como entrada as sete superfamílias bacterianas de MCOs obtidas a partir do banco de dados de lacases e MCOs, Biocatnet LccED v6. (Gräff et al., 2020; Sirim et al., 2011): H—Bacterial CopA, I—Bacterial Bilirubin Oxidase, J—Bacterial CueO, L—Bacterial MCO, K—SLAC-like (tipo B 2dMCO), N—Bacterial type B 2dMCO e O—Archaeal and Bacterial type C 2dMCO. Com isso foi possível identificar que Lac_CB10 é mais similar à classe das lacases CopA, que apresentam maior resistência a cobre (Sirim et al., 2011), uma vez que se agrupou como grupo irmão deste clado com elevado índice de confiança ("Bootstrapping" 91%), conforme mostrado na Figura 13 (Buzzo et al., 2023).

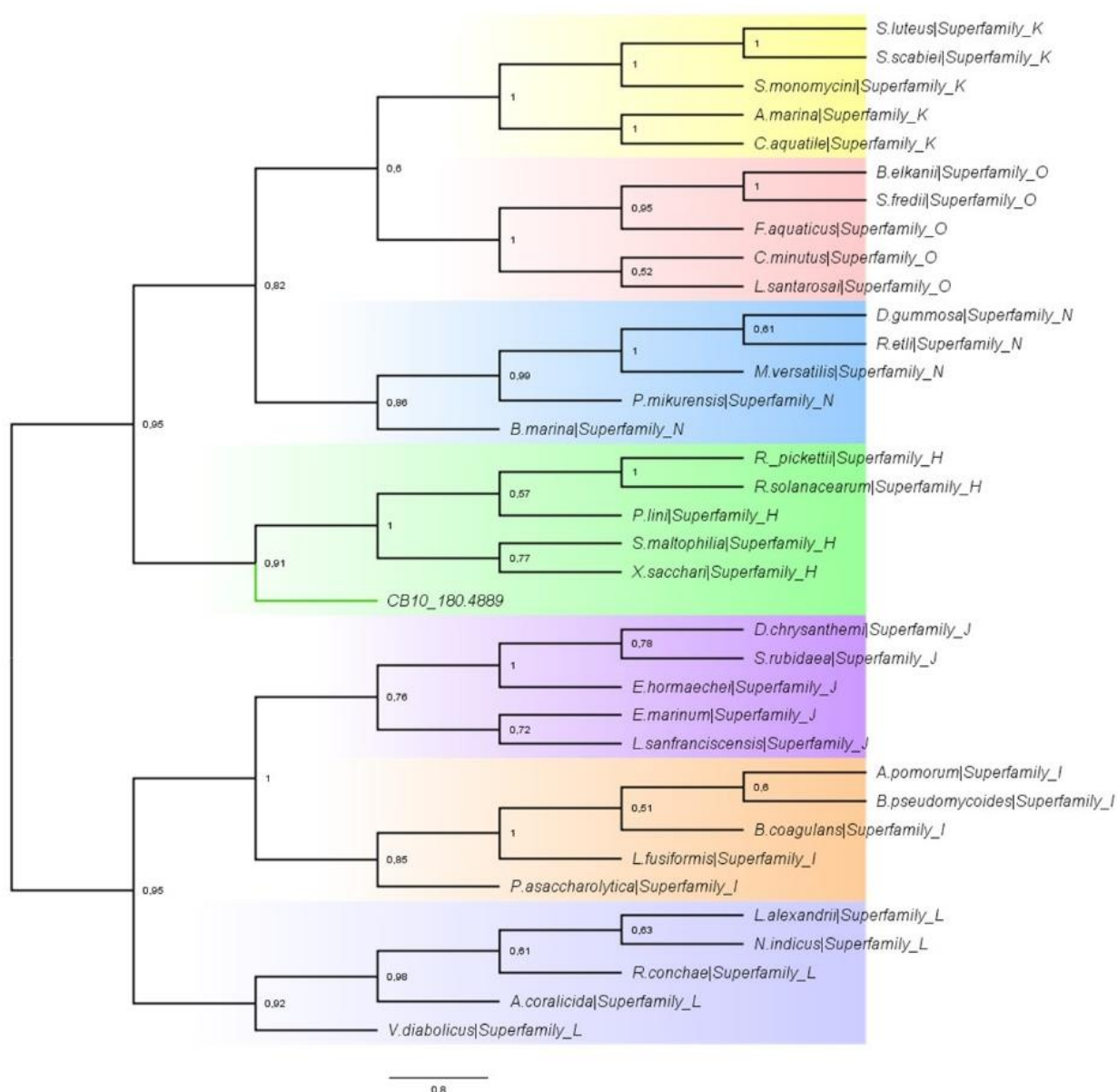


Figura 13. Dendrograma fenético de Lac_CB10 em relação às classes de lacases depositadas no banco de dados de lacases e MCO ("LccED"), com base na matriz de distância gerada a partir de um alinhamento obtido usando o programa Mega 7 por meio da otimização por agrupamento de vizinhos. O clado amarelo indica a superfamília K, o clado rosa indica a superfamília O, o clado azul indica a super-família N, o clado roxo indica a superfamília J, o clado salmão indica a super-família I e o clado azul claro indica a super-família L. O braço verde do clado da super-família H indica que a lacase CB10_180.4889 pertence à classe CopA (Buzzo et al., 2023).

As lacases possuem padrões específicos e conservados L1 (H-W-H-G) e L3 (H-P-x-H-L-H-G-H) que são importantes para o correto funcionamento dos centros de cobre. O padrão L1 possui uma histidina que se liga ao sítio de cobre T2 e uma histidina que se liga ao sítio T3, enquanto a sequência L3 possui ligantes em todos os três sítios de cobre (T1, T2 e T3). Na superfamília H (Bacterial CopA), que apresentou os melhores resultados de homologia para Lac_CB10, 98% das sequências têm origem bacteriana e 83% são registradas como lacases no GenBank; entre essas lacases, 50% possuem a assinatura L1 e 42% possuem a assinatura L3 (Sirim et al., 2011).

Além dos motivos L1 e L3, as lacases têm outros dois motivos conservados que estão diretamente envolvidos na ligação aos sítios de cobre, L2 (H-X-H) e L4 (H-C-H-X-X-X-H-X-X-X-X-M/L/F) (Upadhyay et al., 2020). O conhecimento dos motivos conservados em enzimas conhecidas auxilia na busca e prospecção de alvos em genomas sequenciados, e os motivos de metagenomas são usados como critério inicial de triagem para buscar enzimas de interesse, uma vez que enzimas de outras classes já são descartadas na primeira etapa de seleção. Considerando a alta similaridade com CopA, foi realizado um alinhamento múltiplo com cinco sequências da classe H de lacase (lacase CopA) (Figura 14) para identificar os quatro motivos conservados, L1 (H-W-H-G), L2 (H-X-H), L3 (H-P-x-H-L-H-G-H) e L4 (H-C-H-X-X-X-H-X-X-X-X-M/L/F), que são responsáveis pela coordenação dos três centros de cobre. Além disso, o alinhamento mostrou um alto índice de conservação entre vários blocos nas sequências, reforçando mais uma vez que a enzima pertence a este grupo (Buzzo et al., 2023).

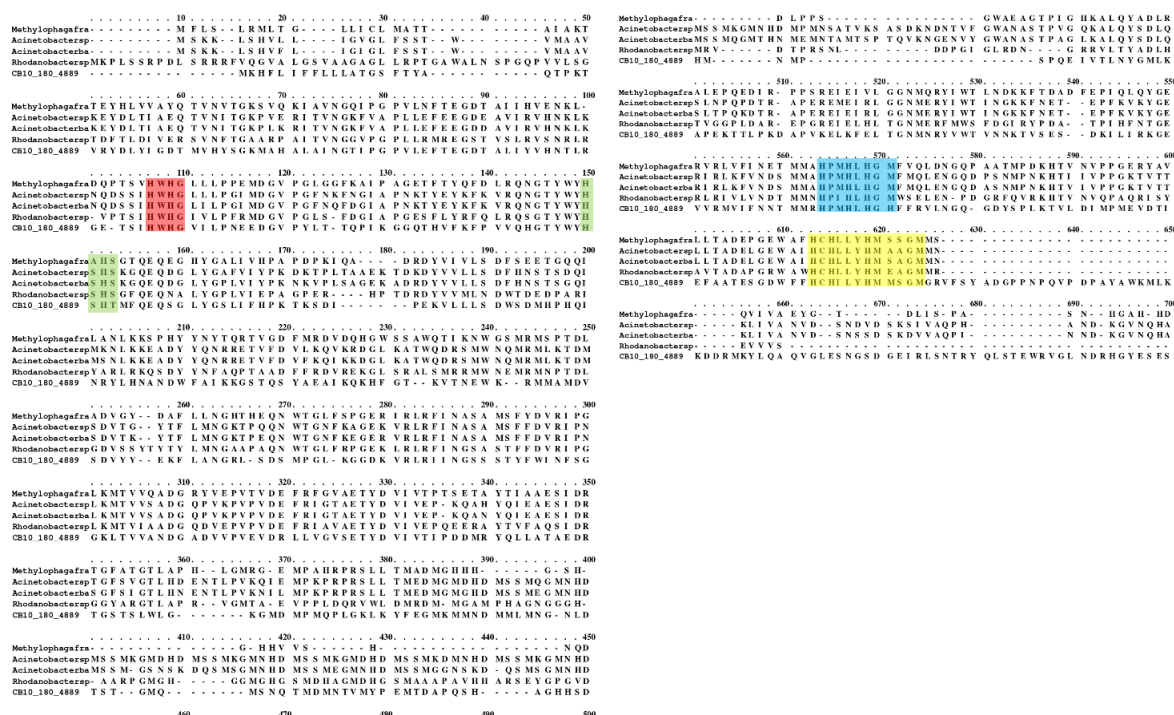


Figura 14. Alinhamento de múltiplas sequências pertencentes à família CopA e nossa Lac_CB10 usando o software Praline (Simossis e Heringa, 2005). As regiões destacadas dentro das caixas indicam os motivos que formam os quatro ligantes de cobre e são altamente conservados em lacases: L1 (H-W-H-G, vermelho), L2 (H-S-H, verde), L3 (H-P-M-H-L-H-G-H, azul) e L4 (H-C-H-I-L-Y-H-M-M-S-G-M, amarelo) (Buzzo et al., 2023).

Para verificar a atividade oxidativa da lacase foi realizada uma eletroforese em condição nativa (sem SDS e sem desnaturação proteica) com catecol e guaiacol, dois substratos específicos para lacase. Como pode ser observado na Figura 15, é possível observar uma banda com atividade oxidativa de lacase para os dois substratos.

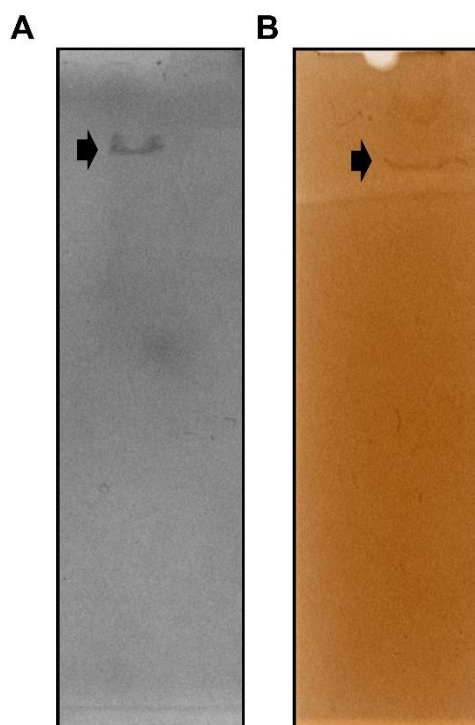


Figura 15. Gel nativo de Lac_CB10 corado com guaiacol 0,02% (A) e catecol 10 mM (B) em tampão CAPS pH 10,5.

3.4. Propriedades espectrais da enzima Lac_CB10

Os espectros de UV-Vis da enzima Lac_CB10 foram medidos em seus estados de apo e holoenzima, antes e após a incubação com o CuSO_4 , respectivamente. Como esperado, a apoenzima não apresentou nenhum espectro de absorção nos comprimentos de onda medidos. Em contrapartida, após a lacase ter complexado os átomos de cobre e preenchido seus sítios de ligação, houve um pico de absorção em torno de 300 nm e nenhum pico em 600 nm (Figura 16A-B).

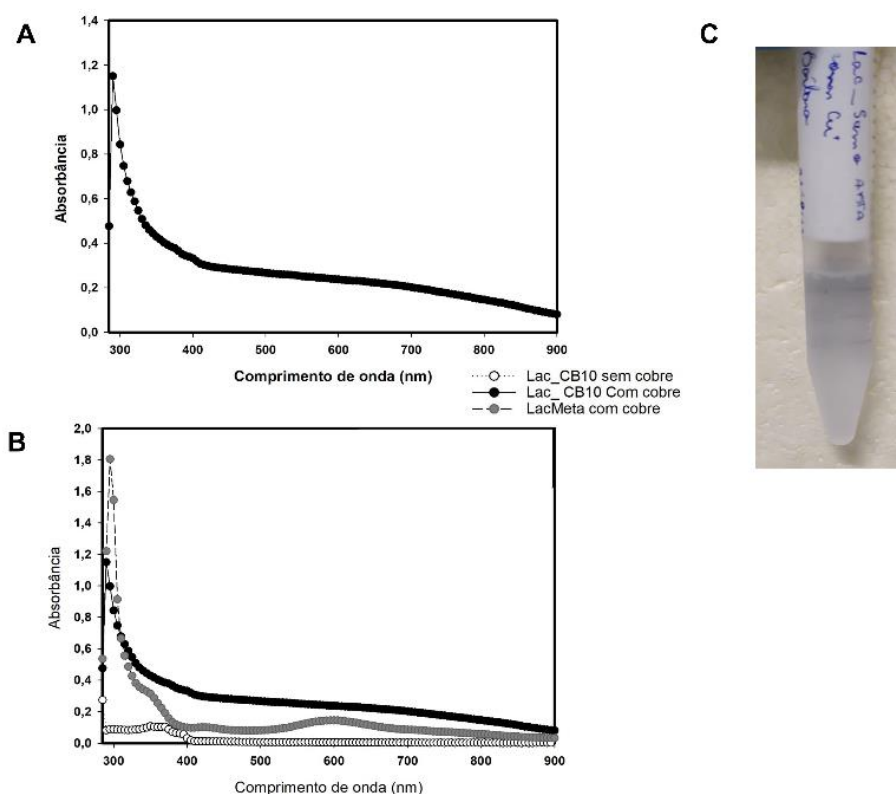


Figura 16. Espectro UV-vis da apoenzima e holoenzima Lac_CB10. A. Espectro UV-vis da Lac_CB10 em sua forma holoenzima, com pico de absorção próximo a 330 nm. B. Espectro UV-vis da Lac_CB10 (círculos pretos) em sua forma apoenzima (sem nenhum pico de absorção) e de holoenzima em comparação com a lacase azul LacMeta (círculos cinzas), mostrando seus picos de absorção em 330 nm e 600 nm. C. Lac_CB10 em sua forma de holoenzima com coloração azulada.

Com exceção das “small” lacases, que apresentam uma subunidade a menos, no geral, as lacases apresentam quatro átomos de cobre por subunidade, independentemente se são monoméricas ou compostas por várias cadeias (Sirim et al., 2011). Estes átomos de cobre estão divididos em três centros cúpricos, sendo eles centro de cobre Tipo 1 ou cobre azul (T1) e possui absorção em 600 nm, centro de cobre Tipo 2 ou cobre normal (T2), que não apresenta absorção no espectro visível e centro de cobre Tipo 3 (T3) ou centros de cobre binuclear acoplado que absorve a luz em cerca de 330 nm (Sondhi et al., 2021).

Embora seja característica geral das lacases e, mesmo da família das MCOs como um todo, possuir os quatro átomos de cobre compondo o centro catalítico, há relatos de lacases caracterizadas em que os cobres foram substituídos por outros

átomos, como por exemplo a lacase de *Pleurotus ostreatus*, que continha apenas um átomo de cobre e os outros foram substituídos por dois íons de zinco e um de ferro (Palmieri et al., 1997) e a de *Trametes hirsuta*, onde um átomo de cobre foi substituído por um átomo de manganês (Kaneko et al., 2009).

Com base nesta característica espectral, Lac_CB10 assume um perfil de picos típicos de lacases amarelas (Cen et al., 2022; Mot et al., 2020) (Figura 16B), como por exemplo a lacase amarela de *Bacillus licheniformis* descrita por Sharma e colaboradores (2020), que apresentou espectro de absorção entre 230-280 nm e ausência de pico em 600 nm, referente ao centro de cobre Tipo 1, responsável por conferir a coloração típica de lacases azuis. O pico de absorção em torno de 300 nm, correspondente a região espectral respectiva ao centro de cobre Tipo 3, é descrito na literatura como responsável por tornar a solução enzimática incolor ou amarela, o que derivou a nomenclatura dessas lacases de espectro incomum como “lacases brancas” ou “amarelas” (Sondhi et al., 2021; Leontievsky et al., 1997).

Entretanto, apesar de apresentar característica espectral típica de lacases amarelas, a preparação enzimática Lac_CB10 adicionada de cobre apresenta coloração azul (Figura 16 C), mesmo não apresentando o pico de absorção no espectro UV-vis em 600 nm. Uma situação semelhante foi relatada por Galai e colaboradores (2014), onde uma lacase bacteriana de *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56 (SmLac) também apresentou coloração azul quando o cobre foi adicionado, porém se comportou como uma lacase amarela no espectro UV-vis. De forma similar, Mot e colaboradores (2020), elucidaram através de análises adicionais de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) as características espectrais da lacase fúngica de *Sclerotinia sclerotiorum*, revelando que apesar das características de uma lacase amarela no espectro UV-vis, a análise de EPR indicou também picos característicos de uma lacase azul.

Curiosamente, os autores encontraram padrões atípicos de oxidação em substratos que derivaram cores não convencionais para diversos substratos, o que levou os autores a proposição de uma nova classe de lacases, as “Rainbow” lacases. Aliado aos nossos resultados, esses dados indicam que ainda há muito a se descobrir sobre os mecanismos de ação e características físico-químicas das lacases, melhorando o ainda confuso sistema de classificação destas enzimas.

3.5. Caracterização bioquímica da Lac_CB10

A avaliação de pH foi realizada em dois momentos. Inicialmente, os primeiros ensaios foram conduzidos com os seguintes tampões: Acetato de Sódio (pH 3, 4,0, 5,0, 5,5 e 6,0); Tris-HCl (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5); e Ampol (pH 9,0, 9,5 e 10,0). Observou-se que a lacase alcançou 100% de sua atividade em tampão Ampol pH 10,0 após 16 h a 37 °C, na presença do substrato guaiacol (Figura 17). No entanto, devido ao alto desvio padrão nas repetições e à queda da atividade no intervalo de pH de 9,0 para 9,5, foram investigados outros conjuntos de tampões.

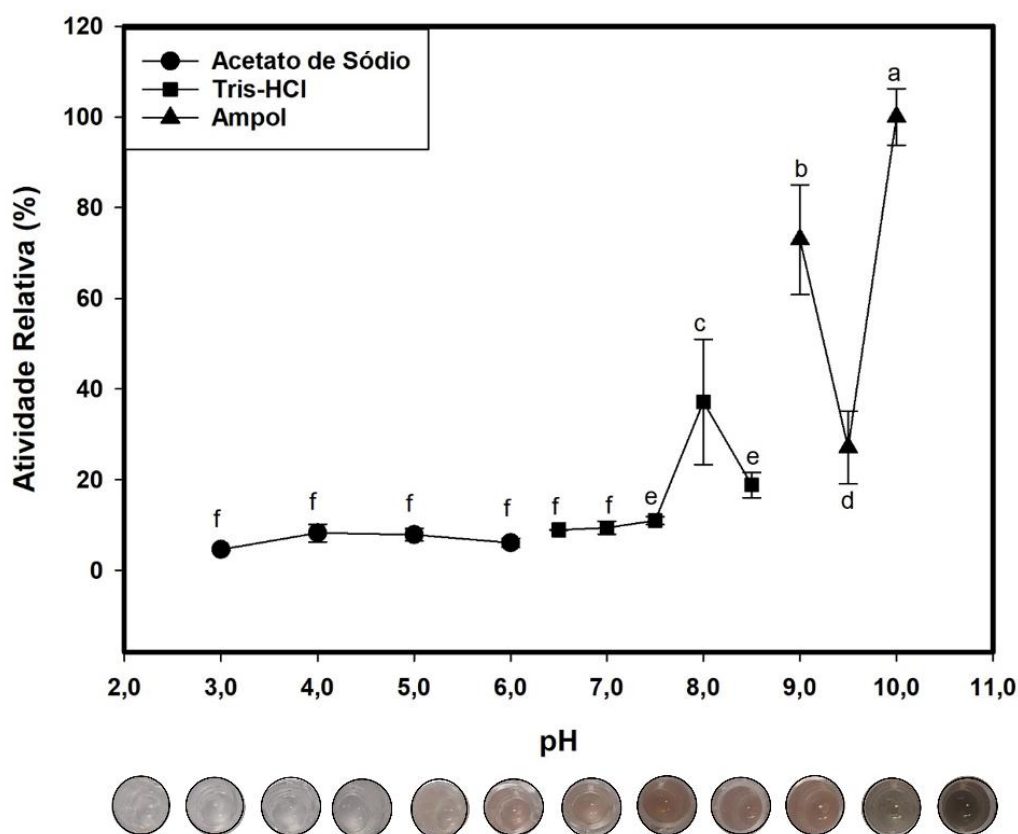


Figura 17. Efeito do pH na atividade de Lac_CB10. A atividade enzimática foi realizada com os seguintes tampões a 20mM: Acetato de Sódio (pH 3, 4,0, 5,0, 5,5 e 6,0); Tris-HCl (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5) e Ampol (pH 9,0, 9,5 e 10,0). Os testes foram realizados com 3 réplicas. Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente, segundo o teste ANOVA e Tukey, com 5% de probabilidade.

Foram avaliados os seguintes tampões: MES (pH 5,5, 6,0, 6,5); PIPES (pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5); MOPS (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0); HEPES (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0); TAPS (pH

8,0, 9,0); CAPS (pH 9,5, 10,0, 10,5, 11,0); Glicina (pH 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5); Bicarbonato de sódio (pH 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 12,0); e Fosfato de potássio (pH 11,0, 11,5, 12,0). Novamente, a maior atividade (100%) da enzima Lac_CB10 foi observada em pH básico (10,5) em tampão CAPS, também após 16 h a 37 °C, com o substrato guaiacol (Figura 18).

Vale ressaltar que o guaiacol é um substrato fenólico que não apresentou mudança de coloração imediata quando adicionado à reação com a lacase, independentemente do pH ou da temperatura ambiente. Somente após 16 h foi possível observar a coloração marrom característica da oxidação do substrato. Como demonstrado na Figura 17, à medida que o pH aumenta, a oxidação do substrato pela enzima se intensifica, resultando em uma coloração marrom mais intensa.

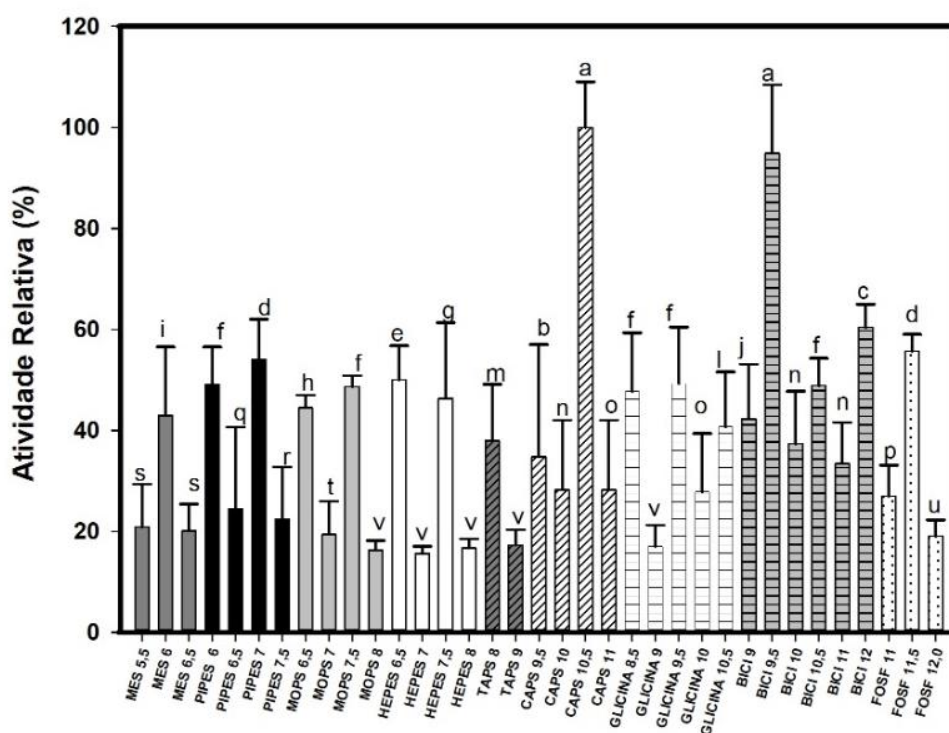


Figura 18. Efeito do pH na atividade de Lac_CB10. A atividade enzimática foi realizada com os seguintes tampões a 20mM: MES (pH 5,5, 6,0, 6,5); PIPES (pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5); MOPS (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0); HEPES (pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0); TAPS (pH 8,0, 9,0); CAPS (pH 9,5, 10,0, 10,5, 11,0); Glicina (pH 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5); Bicarbonato de sódio (pH 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 12,0); e Fosfato de potássio (pH 11,0, 11,5, 12,0). Os testes foram realizados com 3 réplicas. Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente, segundo o teste ANOVA e Tukey, com 5% de probabilidade.

Sabe-se que as lacases apresentam diferentes pHs ótimos para diferentes substratos, uma variação que se deve ao potencial redox distinto entre o cobre tipo 1 da lacase e o substrato. Essa diferença tende a aumentar com o aumento do pH, resultando na transferência de elétrons do centro T1 de cobre e, conseqüentemente, em maior atividade em pH alcalino (Ruijssenaars e Hartmans, 2004). No caso de substratos fenólicos, como o guaiacol, os resultados obtidos são consistentes com a literatura, que relata a maior atividade das lacases em pHs mais básicos. A lacase MSKLAC, proveniente de *Bacillus* sp. MSK-01, foi testada em diferentes substratos (siringaldazina, ABTS, DMP e guaiacol) com pHs ótimos de 7,0; 4,5; 8,0 e 8,0, respectivamente, e demonstrou alta estabilidade em uma faixa de pH entre 5,0 e 10,0 por 24 h (Sondhi et al., 2021).

Curiosamente, a adaptabilidade extremófila da enzima não se limitou apenas a um perfil ótimo de pH fortemente alcalino (pH 10,5), mas também se manifestou em condições elevadas de temperatura. Lac_CB10 exibiu uma atividade relativa baixa (máximo de 40%) sem aumentos significativos entre 37 °C e 60 °C. No entanto, a atividade apresentou um salto significativo a 70 °C, alcançando 68%, e posteriormente teve outro aumento expressivo nas temperaturas de 80 °C (93%) e 90 °C, atingindo sua temperatura ótima com uma atividade relativa de 100% (Figura 19A).

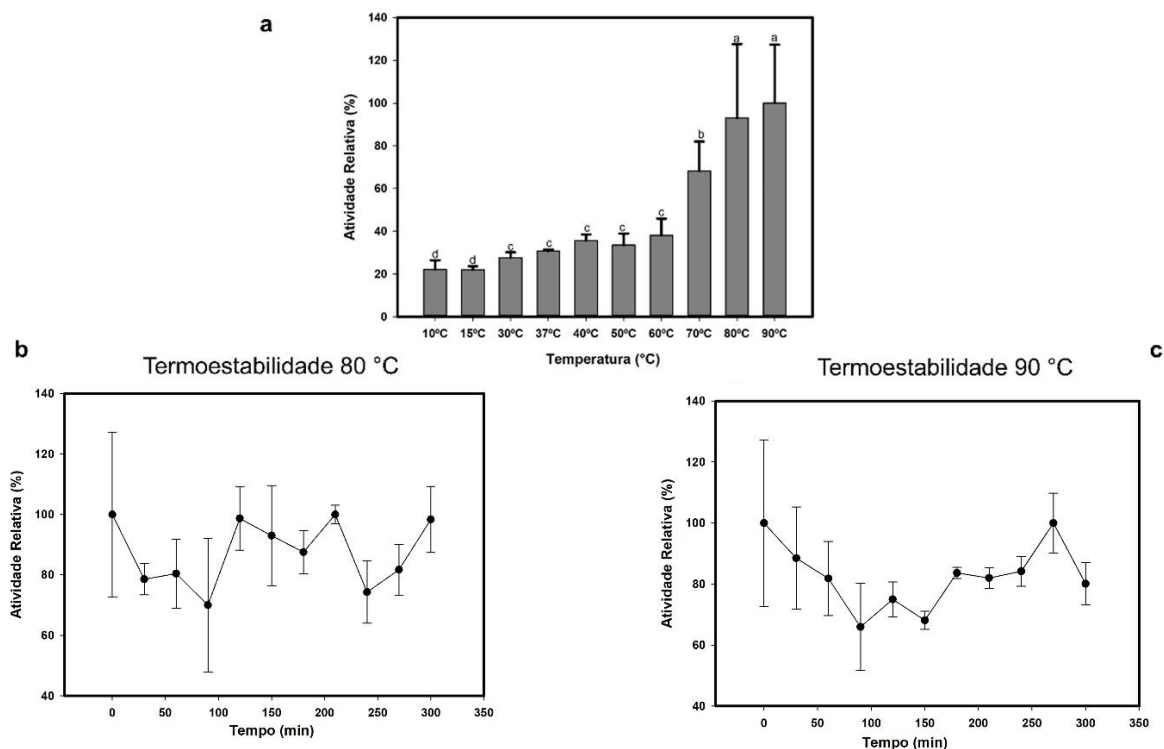


Figura 19. Efeitos da temperatura na atividade de Lac_CB10. A. A atividade enzimática foi realizada nas temperaturas de 10 a 90 °C em tampão CAPS 20mM (pH 10,5). B, C. Os testes de termoestabilidade foram realizados em tampão CAPS 20mM (pH 10,5) por cinco horas a 80 °C e 90 °C. Os testes foram realizados com 3 réplicas. Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente, segundo o teste ANOVA e Tukey, com 5% de probabilidade

A determinação da termoestabilidade (Figura 19 B, C) foi realizada incubando a enzima por cinco horas a 80 °C e 90 °C e medindo sua atividade no substrato guaiacol e no seu pH ótimo. Lac_CB10 demonstrou ser termoestável nas duas temperaturas, onde em ambas manteve sua atividade acima de 50% por cinco horas, sendo que a 80 °C atingiu sua atividade relativa máxima de 100% (Figura 19 B) em 270 min e em 90 °C (Figura 19 C) em 210 min. A atividade prolongada da enzima em altas temperaturas é considerada um parâmetro vital para satisfazer os requisitos comerciais, por isso lacases com boas propriedades termotolerantes são importantes para processos industriais, como a produção de alimentos, o branqueamento de polpa de papel, indústria de tecidos e biorremediação, onde as altas temperaturas podem ser um fator inevitável.

Um fato intrigante relacionado à atividade de Lac_CB10 em altas temperaturas, bem como à sua termoestabilidade, é que essa enzima não foi prospectada de fontes termofílicas. No entanto, é importante destacar que Lac_CB10 não é a primeira enzima termofílica descoberta em *Chitinophaga* sp. CB10. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu uma metalocarboxipeptidase hipertermofílica proveniente da mesma fonte (Fernandes et al., 2021), evidenciando o potencial das fontes bacterianas para a obtenção de enzimas de interesse industrial. Além disso, com base nos dados espectrais, é possível que Lac_CB10 seja classificada como uma lacase amarela, o que reforça sua alta capacidade de estabilidade e funcionalidade em condições extremas, características associadas ao grupo das ainda pouco conhecidas lacases amarelas (Mot et al., 2020).

Embora não frequente, a condição extremófila também já foi relatada para algumas lacases azuis bacterianas, como as prospectadas de resíduos agroindustriais produzidas por *Bacillus aquimaris* AKRCO2, que apresentou estabilidade térmica a 75 °C com meia vida de quatro h em substrato guaiacol (Kumar et al., 2022), bem como lacases de *Alcaligenes faecalis*, apresentando atividade ótima de 80 °C e estabilidade térmica na faixa de 70-90 °C, onde a atividade foi medida monitorando a oxidação do 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) (Mehandia et al., 2020). A estabilidade de lacases purificadas em várias temperaturas mostra o potencial para aplicações industriais na alternativa de plásticos sintéticos, produtos químicos e biocombustíveis através de processos incluindo bioresíduos (Mehandia et al., 2020).

Similarmente, lacases obtidas de *Bacillus* sp. estirpe WT, *Bacillus* sp. PK4, *Thermobifida fusca*, *Bacillus tequilensis* SN4 e *Geobacillus thermocatenulatus* (Siroosi et al., 2016; Rajeswari e Bhuvaneswari, 2016; Chen et al., 2013) mostraram atividade ótima na faixa de 50 °C a 70 °C, mas possuíam meia-vida curta, perdendo rapidamente sua atividade em altas temperaturas. Lac_CB10 foi capaz de manter sua atividade acima de 50% por cinco h nas duas temperaturas testadas de 80 °C e 90 °C, sendo de grande importância nos processos industriais.

A capacidade de enzimas demonstrarem atividade em temperaturas elevadas oferece uma série de vantagens significativas em diversos processos industriais e biotecnológicos. Em primeiro lugar, a elevada temperatura aumenta a taxa de

reação, uma vez que as moléculas apresentam maior energia cinética, acelerando a conversão dos substratos em produtos. Além disso, a solubilidade dos substratos tende a ser aprimorada em temperaturas mais altas, facilitando o acesso da enzima a esses substratos e, conseqüentemente, melhorando a eficiência da reação enzimática. Outro benefício fundamental é a maior estabilidade e vida útil das enzimas termotolerantes em condições de temperatura elevada, reduzindo a necessidade de substituição frequente e possibilitando seu uso prolongado em processos contínuos (Sharma et al., 2019).

Para avaliar o efeito de inibidores e íons sobre a atividade da lacase, foram utilizados os parâmetros de pH ótimo (CAPS pH 10,5) e temperatura ideal (90 °C). Diversos inibidores foram testados, abrangendo álcoois, cetonas e detergentes, incluindo SDS, Triton x-100 e Tween 80, nas concentrações de 0,5% e 1% (v/v), EDTA e DTT nas concentrações de 1 mM, 5 mM e 10 mM, além de metanol e acetona a 1%, 2% e 5% (v/v).

Os resultados revelaram que todos esses inibidores reduziram significativamente a atividade enzimática, mantendo-a abaixo de 30%, com exceção do detergente Triton x-100, que apresentou uma atividade um pouco mais elevada (42%) em comparação aos outros inibidores, embora ainda relativamente baixa (Tabela 3).

Tabela 3. Influência de inibidores na atividade enzimática da lacase. As reações foram feitas utilizando SDS, Triton x-100 e Tween 80, nas concentrações de 0,5% e 1% (v/v), EDTA e DTT nas concentrações de 1 mM, 5 mM e 10 mM, além de metanol e acetona a 1%, 2% e 5% (v/v). As letras minúsculas indicam a diferença significativa entre cada condição realizada. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a probabilidade de 5%.

Inibidor	Concentração	Atividade Relativa (%)	
Metanol	1%	20,4 ± 0,1	d
Metanol	2%	25,5 ± 1,1	c
Metanol	5%	22,9 ± 1,8	d
Acetona	1%	15,6 ± 0,8	d
Acetona	2%	13,2 ± 0,8	d
Acetona	5%	15,9 ± 0,4	d
SDS	0,5%	14,5 ± 0,8	d
SDS	1%	16,2 ± 0,5	d
Triton X-100	0,5%	14,5 ± 0,17	d
Triton X-100	1%	42,0 ± 8,2	b
Tween 20	0,5%	15,1 ± 0,7	d
Tween 20	1%	18,2 ± 2,2	d
EDTA	1 mM	17,2 ± 1,6	d
EDTA	5 mM	19,2 ± 1,0	d
EDTA	10 mM	16,9 ± 0,7	d
DTT	1 mM	14,7 ± 0,4	d
DTT	5 mM	17,7 ± 1,8	d
DTT	10 mM	23,8 ± 22,7	d
Controle		100	a

A avaliação dos íons CuSO₄, MgSO₄, NiCl₂, CaCl₂, NaCl₂, CoCl₂, KCl, FeSO₄, MnSO₄, Al₂(SO₄)₃, Li₂SO₄, AgNO₃, BaCl₂, ZnSO₄, CdCl₂ e KI revelou um aumento na atividade relativa de aproximadamente 130% na presença de Cu²⁺ e 122% na presença de Cd²⁺. Todos os outros íons testados não demonstraram eficácia significativa na ativação da Lac_CB10. O íon Mn²⁺ não teve impacto significativo na atividade (70%), enquanto o íon Ni²⁺, por outro lado, exerceu um efeito altamente inibitório sobre a atividade enzimática, reduzindo-a para 13% da atividade relativa (Tabela 4).

Tabela 4. Influência de íons na atividade enzimática da lacase. As reações foram feitas utilizando CuSO_4 , MgSO_4 , NiCl_2 , CaCl_2 , NaCl , CoCl_2 , KCl , FeSO_4 , MnSO_4 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, Li_2SO_4 , AgNO_3 , BaCl_2 , ZnSO_4 , CdCl_2 e KI na concentração de 2 mM. As letras minúsculas indicam a diferença significativa entre cada condição realizada. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com ANOVA e teste de Tukey a probabilidade de 5%.

Íon	Atividade Relativa (%)	
CuSO_4	$129,7 \pm 20,8$	c
MgSO_4	$43,2 \pm 21,1$	f
NiCl_2	$12,8 \pm 2,1$	l
CaCl_2	$44,3 \pm 0,9$	e
NaCl	$16,8 \pm 0,3$	l
CoCl_2	$24,4 \pm 2,8$	h
KCl	$20,9 \pm 1,1$	j
FeSO_4	$40,3 \pm 3,0$	g
MnSO_4	$69,6 \pm 8,2$	d
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	$16,1 \pm 0,8$	l
Li_2SO_4	$17,1 \pm 0,2$	l
AgNO_3	$21,7 \pm 1,0$	i
BaCl_2	$26,8 \pm 0,5$	h
ZnSO_4	$15,9 \pm 0,3$	l
CdCl_2	$121,9 \pm 1,2$	b
KI	$21,0 \pm 1,3$	j
Controle	100	a

3.6. Degradação Enzimática e Microscopia Eletrônica de Varredura de Lignina

O ensaio contendo apenas a célula bacteriana e lignina mostrou 16,33% de degradação, enquanto o ensaio contendo cobre como indutor conseguiu degradar 52,27%. A Microscopia eletrônica de varredura foi realizada para verificar mudanças estruturais na lignina, onde é possível observar que o tratamento sem cobre, somente com a enzima, não apresentou mudanças significativas (Figura 20 A e B), enquanto o tratamento com cobre obteve mudanças estruturais significativas, alterando drasticamente a superfície (Figura 20 C e D).

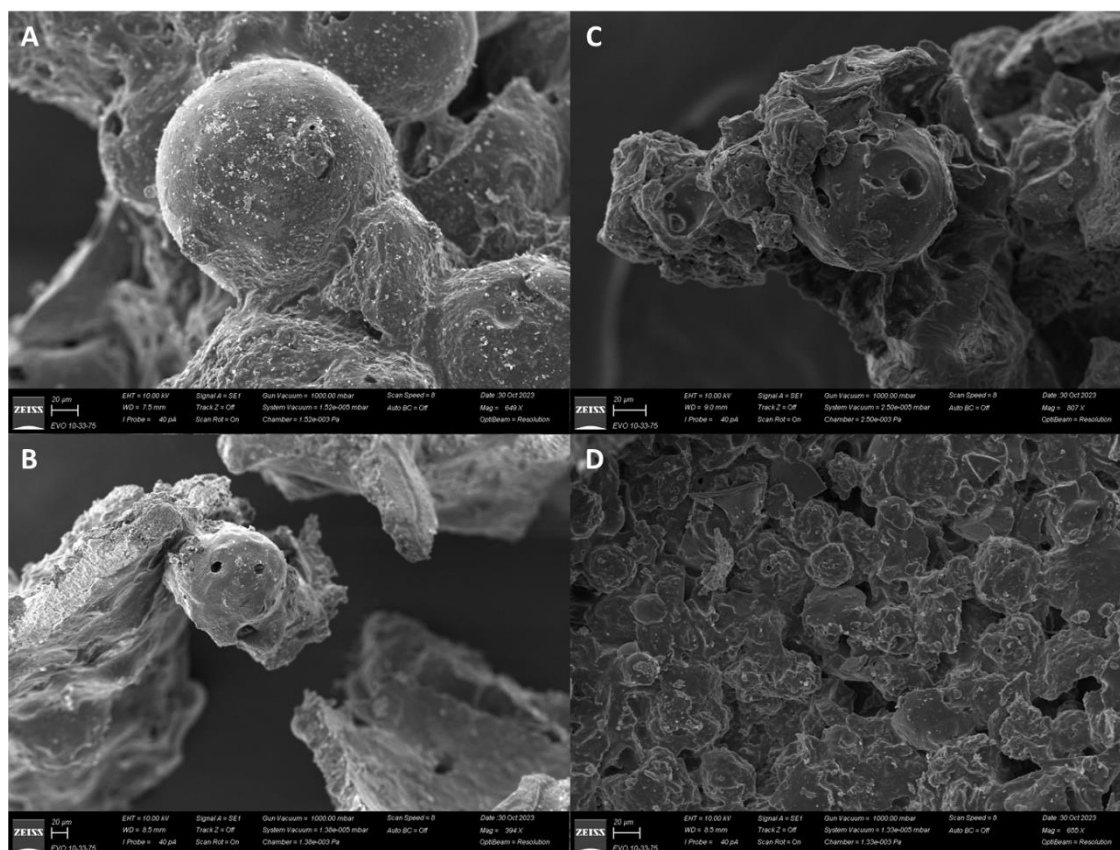


Figura 20. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) da degradação de lignina alcalina. Tratamento sem indutor (A - controle abiótico e B - tratamento) e tratamento com cobre (C - controle abiótico e D - tratamento). Os experimentos foram conduzidos a 55 °C por 32 h a 150 rpm.

Estes resultados são significativos, uma vez que o uso de indutores comerciais, como o IPTG, pode aumentar os custos industriais do processo. Assim, a substituição por indutores mais econômicos, como o cobre neste estudo, é vantajosa. O fato de a Lac_CB10 exibir capacidade de degradação mesmo na ausência de um indutor (20B), embora não tão proeminente quanto na presença de cobre (20D), demonstra que esta enzima realmente possui potencial para degradação de lignina.

Os resultados de degradação superaram os relatados por Khan e colaboradores (2024), onde uma enzima CotA-SL7 purificada de *Bacillus altitudinis* alcançou 31,2% de degradação após 20 h a pH 5,0. Isso sugere que a atividade enzimática pode ser ainda mais otimizada, especialmente quando a enzima é purificada e utilizada em seu pH ótimo para atividade. Em contraste, a Lac_CB10 foi utilizada dentro de células e no pH de crescimento celular, em vez do pH ótimo para

atividade enzimática, e mesmo assim exibiu alta eficácia de degradação. Isso ressalta a robustez da Lac_CB10 e seu potencial para degradação eficiente de lignina em condições menos ideais.

Lac_CB10 é uma nova lacase bacteriana que se diferencia das outras lacases relatadas, pois demonstrou alta capacidade de degradação de lignina sem a necessidade de ABTS como mediador. Ao contrário da maioria das lacases bacterianas relatadas, que requerem ABTS como mediador para exibir forte capacidade de degradação da lignina (Hilgers et al., 2018; Singh et al., 2017), Lac_CB10 destaca-se por sua eficiência autônoma. Em suma, Lac_CB10 representa um biomaterial de alto potencial, promissor para uso na degradação da lignina para aplicações industriais futuras.

4. Conclusão

No melhor do nosso conhecimento, Lac_CB10 representa uma significativa descoberta das lacases amarelas, sendo a primeira descrita para o gênero *Chithitinophaga*, apresentando características termofílicas e alcalinas, que conotam fortemente que se trata de uma enzima muito promissora para processos industriais, que são frequentemente realizados em ambientes de altas temperaturas e condições extremas de pH. Seus notáveis níveis de atividade em condições extremas de pH (10,5) e temperatura (80 °C e 90 °C) com substrato guaiacol a posicionam como uma potencial candidata para processos industriais, particularmente em pré-tratamentos enzimáticos para produção de etanol 2G.

Além disso, o estudo dessa enzima abre caminho para avanços significativos na prospecção biotecnológica, com potencial para aprimorar processos existentes e fomentar o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis e eficientes. Portanto, a continuidade das pesquisas nesse campo não só pode otimizar práticas industriais, mas também desencadear inovações substanciais, expandindo o horizonte de aplicações práticas e impulsionando o progresso na biotecnologia.

5. REFERÊNCIAS

- Bento, I., Carrondo, M. A. & Lindley, P. F. (2006). *J Biol Inorg Chem* **11**, 539–547.
- Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Buzzo, B. B. (2019). Análise in silico, expressão e purificação de uma nova lacase bacteriana de *Chitinophaga* sp. CB10. Universidade Estadual Paulista (Unesp).
- Buzzo, B. B., Giuliatti, S., Pereira, P. A. M., Gomes-Pepe, E. S. & Lemos, E. G. de M. (2023). *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 9785.
- Castro-Sowinski, S., Martinez-Drets, G. & Okon, Y. (2002). *FEMS Microbiology Letters* **209**, 119–125.
- Cen, Q., Wu, X., Cao, L., Lu, Y., Lu, X., Chen, J., Fu, G., Liu, Y. & Ruan, R. (2022). *AMB Expr* **12**, 96.
- Chaoua, S., Chaouche, N. K., Songulashvili, G., Gares, M., Hiligsmann, S. & Flahaut, S. (2023). *Journal of Biotechnology* **361**, 99–109.
- Chen, C.-Y., Huang, Y.-C., Wei, C.-M., Meng, M., Liu, W.-H. & Yang, C.-H. (2013). *AMB Expr* **3**, 49.
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R. A., Short, J. M., Olsen, G. J. & Swanson, R. V. (1998). *Nature* **392**, 353–358.
- Fernandes, G. C., Sierra, E. G. M., Brear, P., Pereira, M. R. & Lemos, E. G. M. (2021). *Microorganisms* **9**, 393.
- Galai, S., Korri-Yousoufi, H. & Marzouki, M. N. (2014). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **89**, 1741–1750.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.-L. & Bally, R. (1993). *FEMS Microbiology Letters* **108**, 205–210.
- Gräff, M., Buchholz, P. C. F., Le Roes-Hill, M. & Pleiss, J. (2020). *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **88**, 1329–1339.
- Hall, T. A (1999). *Nucleic Acids Symp Ser* 95-98.
- Hilgers, R., Vincken, J.-P., Gruppen, H. & Kabel, M. A. (2018). *ACS Sustainable Chem. Eng.* **6**, 2037–2046.
- Kaneko, S., Cheng, M., Murai, H., Takenaka, S., Murakami, S. & Aoki, K. (2009). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **advpub**, 0903091369–0903091369.
- Khan, S. I., Sahinkaya, M., Colak, D. N., Zada, N. S., Uzuner, U., Belduz, A. O., Çanakçı, S., Khan, A. Z., Khan, S., Badshah, M. & Shah, A. A. (2024). *Enzyme and Microbial Technology* **172**, 110329.

- Kishi, L. T., Lopes, E. M., Fernandes, C. C., Fernandes, G. C., Sacco, L. P., Carareto Alves, L. M. & Lemos, E. G. M. (2017). *Genome Announcements* **5**, e01056-16.
- Komori, H. & Higuchi, Y. (2015). *The Journal of Biochemistry* **158**, 293–298.
- Kumar, A., Singh, A. K., Bilal, M. & Chandra, R. (2022). *Catal Lett* **152**, 1784–1800.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**, 680–685.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N. & Golovleva, L. (1997). *FEBS Letters* **413**, 446–448.
- Lima, N. S. M., Gomes-Pepe, E. S., Campanharo, J. C. & De Macedo Lemos, E. G. (2022). *AMB Expr* **12**, 38.
- Machczynski, M. C., Vijgenboom, E., Samyn, B. & Canters, G. W. (2004). *Protein Science* **13**, 2388–2397.
- Makwana, K. M. & Mahalakshmi, R. (2015). *Protein Science* **24**, 1920–1933.
- Mate, D. M., Garcia-Ruiz, E., Camarero, S., Shubin, V. V., Falk, M., Shleev, S., Ballesteros, A. O. & Alcalde, M. (2013). *Biocatalysis and Biotransformation* **31**, 8–21.
- Mehandia, S., Sharma, S. C. & Arya, S. K. (2020). *Biotechnology Reports* **25**, e00413.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D. & Bateman, A. (2021). *Nucleic Acids Research* **49**, D412–D419.
- Mot, A. C., Coman, C., Hadade, N., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, R. & Heering, H. (2020). *PLOS ONE* **15**, e0225530.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. & Sannia, G. (1997). *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31301–31307.
- Pardo, I., Santiago, G., Gentili, P., Lucas, F., Monza, E., Medrano, F. J., Galli, C., Martínez, A. T., Guallar, V. & Camarero, S. (2016). *Catal. Sci. Technol.* **6**, 3900–3910.
- Pozdnyakova, N. N., Rodakiewicz-Nowak, J. & Turkovskaya, O. V. (2004). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **30**, 19–24.
- Radveikienė, I., Vidžiūnaitė, R., Meškienė, R., Meškys, R. & Časaitė, V. (2021). *Journal of Fungi* **7**, 143.
- Rajeswari, M. & Bhuvaneswari, V. (2016). *African Journal of Biotechnology* **15**, 1813–1826.

- Rambaut, Andrew. (2010). *Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh*.
- Ruijsenaars, H. J. & Hartmans, S. (2004). *Appl Microbiol Biotechnol* **65**, 177–182.
- Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S. & Bajaj, B. K. (2019). Vol. *Advances in Enzyme Technology*. pp. 469–495. Elsevier.
- Sharma, V., Upadhyay, L. S. B. & Vasanth, D. (2020). *Appl Biochem Microbiol* **56**, 420–432.
- Simossis, V. A. & Heringa, J. (2005). *Nucleic Acids Research* **33**, W289–W294.
- Singh, R., Hu, J., Regner, M. R., Round, J. W., Ralph, J., Saddler, J. N. & Eltis, L. D. (2017). *Sci Rep* **7**, 42121.
- Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R. D. & Pleiss, J. (2011a). *Database* **2011**, bar006.
- Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R. D. & Pleiss, J. (2011b). *Database* **2011**, bar006–bar006.
- Siroosi, M., Amoozegar, M. A. & Khajeh, K. (2016). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **134**, 89–97.
- Sondhi, S., Kaur, R. & Madan, J. (2021). *International Journal of Biological Macromolecules* **170**, 232–238.
- Sondhi, S., Sharma, P., George, N., Chauhan, P. S., Puri, N. & Gupta, N. (2015). *3 Biotech* **5**, 175–185.
- Yang, P.-C. & Mahmood, T. (2012). *North Am J Med Sci* **4**, 429.

CAPÍTULO 3 – Ensaio de expressão heteróloga de uma mono-oxigenase lítica de polissacarídeo (LPMO) potencialmente envolvida com a desconstrução de biomassa

RESUMO - O crescente interesse nos processos mediados por enzimas tem despertado a atenção da comunidade científica, uma vez que elas oferecem vantagens notáveis, incluindo a redução no tempo de processo e no custo efetivo, devido à sua capacidade de operar em condições mais brandas de temperatura e pressão. Um grupo de enzimas que tem ganhado destaque no setor sucroalcooleiro são as Mono-oxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs), que desempenham um papel fundamental na degradação enzimática da celulose, pois são capazes de clivar oxidativamente as ligações glicosídicas presentes nesse material, tornando o substrato mais suscetível à hidrólise pelas celulasas. Este trabalho teve como objetivo realizar a expressão heteróloga de três novas LPMOs prospectadas de um metagenoma de torta de filtro (sc_181539), de um metagenoma de um consórcio degradador de biomassa (LPMO_cons) e do genoma de *Bacillus thurigiensis* (LPMOBT). Os resultados negativos mostraram que a expressão desta enzima não é trivial, necessitando de mais estudos sobre o funcionamento dela.

Palavras-chave: expressão heteróloga, etanol 2G, metagenoma, biotecnologia

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos remonta a, pelo menos, 6000 a.C., quando civilizações antigas empregavam esses microrganismos na produção de bebidas

alcoólicas, como cerveja e vinho, bem como na panificação e na fabricação de queijos. Atualmente, os microrganismos e suas diversas enzimas são objeto de estudo em diversos setores industriais, incluindo alimentos, química, medicina e energia. O interesse por processos mediados por enzimas tem crescido significativamente, uma vez que esses processos oferecem vantagens como redução no tempo de produção, custo efetivo e características não-tóxicas e amigáveis ao meio ambiente.

As enzimas são classificadas em seis classes com base em suas reações: Oxirredutases (EC 1), responsáveis por reações de oxirredução; Transferases (EC 2), que catalisam a transferência de grupos funcionais; Hidrolases (EC 3), envolvidas na hidrólise de diversas reações; Liases (EC 4), responsáveis pela clivagem de ligações não hidrolíticas e oxidação; Isomerases (EC 5), que promovem reações de isomerização em uma única molécula; e Ligases (EC 6), que catalisam a formação de ligações covalentes (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

A biomassa lignocelulósica, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, é uma fonte altamente desejada para a produção de biocombustíveis (Sannigrahi et al., 2010). No entanto, para a conversão eficiente dessa biomassa em biocombustíveis, são necessários pré-tratamentos, sendo os processos enzimáticos preferidos devido às desvantagens dos métodos físicos e químicos que requerem condições extremas (Wang et al., 2018).

Dentre todas as enzimas utilizadas na indústria, as hidrolíticas são as mais usadas comercialmente, porém todas as outras classes possuem suas especificidades e importância biotecnológica. As oxirredutases, por exemplo, catalisam reações de oxirredução, envolvendo a transferência de elétrons para outras espécies químicas, reduzindo-as. As Mono-oxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs) são exemplos de enzimas pertencentes a essa classe, com elevado potencial oxidativo e relevância na composição de coquetéis enzimáticos devido à sua alta capacidade sinérgica (Villares et al., 2017).

Naturalmente, as LPMOs são encontradas em fungos e bactérias, sendo mais abundantes em fungos saprófitos, alguns dos quais podem conter mais de 30 genes que codificam essas enzimas (Levasseur et al., 2013). Essas enzimas são classificadas no banco de dados CAZy em quatro famílias: AA9, anteriormente conhecidas como família glicosil hidrolases 61 (GH61); AA10, anteriormente

chamadas de família de módulos de ligação a carboidratos 33 (CBM33); AA11 e AA13 (Eijsink et al., 2019a; Hemsworth et al., 2014). As enzimas das famílias AA9 e AA11 são predominantemente de origem fúngica e atuam em diversos substratos, incluindo celulose, oligossacarídeos, hemicelulose, quitina e xilana. LPMOs da família AA10 são encontradas em todos os domínios, mas são mais comuns em genomas bacterianos e virais, onde inicialmente se acreditava que estavam ligadas à quitina sem função catalítica, mas agora sabe-se que são ativas em celulose e quitina. Enzimas pertencentes à família AA13 foram identificadas apenas em fungos e atuam em derivados de amido (Vu et al., 2014; Forsberg et al., 2014).

As LPMOs são consideradas altamente eficientes na degradação enzimática da celulose, pois têm a capacidade de clivar oxidativamente as ligações glicosídicas, tornando o substrato mais suscetível à hidrólise pelas celulasas (Villares et al., 2017), desempenhando um papel fundamental na indústria de etanol de segunda geração, sendo componentes essenciais de coquetéis enzimáticos (Harris et al., 2014; Johansen, 2016).

Considerando a alta aplicabilidade das LPMOs, este trabalho teve como objetivo expressar, purificar e caracterizar uma nova LPMO prospectada de genomas e metagenomas do banco de dados do LBMP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Prospecção dos genes em banco de dados e análise das sequências

As sequências relacionadas às LPMOs foram identificadas através da prospecção em diferentes fontes de metagenoma. Isso incluiu o metagenoma da torta de filtro (Omori et al., 2019), um subproduto da fabricação de açúcar, que é notável por ser rico em matéria orgânica, como lignocelulose, fósforo e outros nutrientes. Este ambiente é favorável para o crescimento de microrganismos capazes de sintetizar carboidrases. Além disso, foram utilizadas sequências de um consórcio microbiano (registrado no SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado sob o número A390589) obtido de uma pilha de

bagaço de cana-de-açúcar, caracterizada por uma alta taxa de degradação de biomassa e cultivada exclusivamente em carboximetilcelulose como fonte de carbono (Constancio et al., 2020). Também foram consideradas sequências do genoma de *Bacillus thuringiensis*, todas acessíveis na base de dados do LBMP.

A prospecção das enzimas LPMOs foi realizada com base em genes ortólogos e busca por HMM (“Hidden Markov Model”). Estas sequências foram então analisadas em uma plataforma “online” chamada Pfam (Mistry et al., 2021), que permite a visualização de quantos domínios a sequência apresenta, se esses estão ou não completos, e ao grupo à qual pertence. Deste modo, foram selecionadas aquelas sequências que possuíam domínios completos e pertenciam ao grupo das LPMOs.

O último passo da triagem foi analisar o grau de similaridade compartilhado entre a sequência selecionada com enzimas já caracterizadas na base de dados americana do “National Center for Biotechnology Information” NCBI (coleção “Non-redundant UniProtKB/SwissProt sequences”), utilizando a ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) bem como a sua similaridade com banco de patentes desta mesma base de dados (coleção “Patented protein sequences (pataa)).

As características gerais das LPMOs selecionadas, como massa molecular, ponto isoelétrico, quantidade de aminoácidos e outras informações, foram analisadas pela ferramenta ExPASy-ProtParam (Gasteiger et al., 2005). A presença de peptídeo sinal também foi analisada através da ferramenta SignalP (Nielsen, 2017) e foi utilizada a plataforma “online” TMHMM Server v. 2.0 (Krogh et al., 2001) para investigar se a sequência selecionada codificava uma proteína com regiões transmembrana.

2.2. Clonagem dos genes codificadores de LPMO

Uma vez identificadas as ORFs codificadoras de LPMO nos bancos de dados, prosseguiu-se a clonagem. A ORF sc1815_39 oriunda da prospecção do metagenoma de torta de filtro foi sintetizada artificialmente pela empresa GenOne

(<http://www.genone.com.br>), em vetor pET-24(+) (Figura 1). Este vetor possui uma tag de histidina na região C-terminal e locais de restrição para as enzimas BamHI e HindIII. Ficar atento à posição da cauda de histidina é importante pois nas LPMOs o grupo N-terminal e a cadeia lateral de histidina fazem parte do sítio ativo da enzima, portanto, uma cauda de purificação na região N-terminal, como é mais comumente usada, deixaria a enzima inativa. Segundo a literatura, tags na região C-terminal foram utilizadas com sucesso, recuperando enzimas purificadas e ativas (Eijsink et al., 2019).

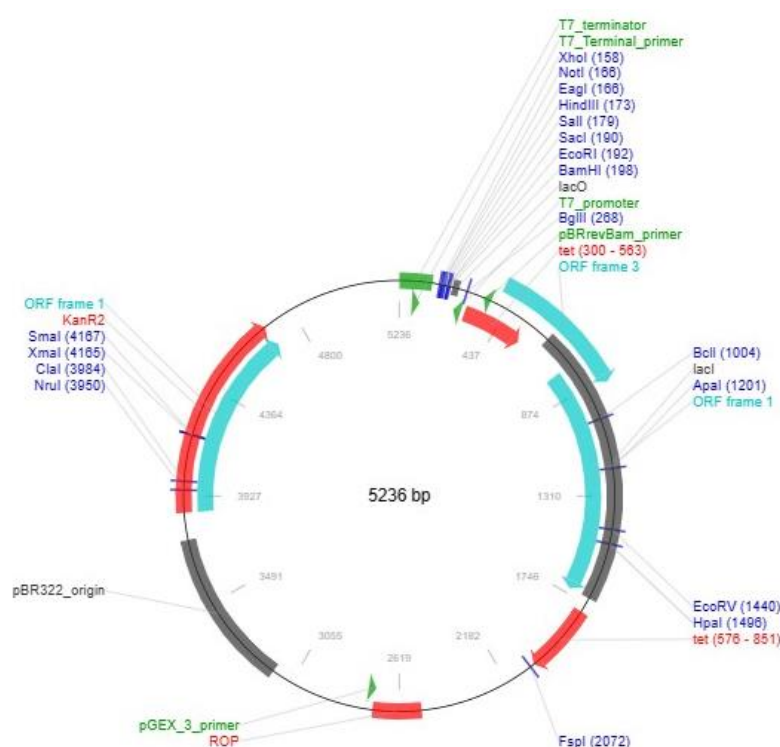


Figura 1. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET-24a.

A ORF prospectada do consórcio degradador de biomassa (LPMO_cons) foi clonada em vetor pET28a+ e amplificada utilizando os primers F16 (5' – TATAgattcGGGTCCGTCACC - 3') e R7 (5'- GCGCGGCGTCATGAaagctt - 3'), com sítios de restrição para as enzimas EcoRI e HindIII respectivamente. Já a ORF oriunda do genoma de *B. thuringiensis* (LPMO_BT) também foi clonada em vetor pET28a+, e amplificada utilizando os primers F3 (5' – ggatccCATGGATATGTAGAATCACC -3') e

R2 (5'- ctcgagTTAAAATAGTGTAGGAGCTTGC - 3'), com sítios de restrição para as enzimas BamHI e XhoI, respectivamente e no vetor PHT08, utilizando os primers F2 (5'-GCggatccCATGGATATGTAGAATCACC-3') e R5 (5'-AGCATgacgtcTTAAAATAGTGTAGGAGCTTG - 3'), com sítios para as enzimas BamHI e AatII, respectivamente.

Para todas as construções os primers foram desenhados manualmente e sua qualidade foi avaliada por meio da ferramenta online PCR Primer Stats ("Sequence Manipulation Suits," www.bioinformatics.org), com objetivo de verificar a porcentagem de conteúdo GC, a temperatura de anelamento e a formação de estruturas secundárias.

Os parâmetros de ciclagem das PCRs utilizados para amplificar os três genes foram uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, pareamento dos primers a 65, 62 e 50 °C (respectivamente para cada gene) por 45 segundos, extensão do gene pela DNA polimerase a 72 °C por 1 min e, por fim, uma extensão de 10 min a 72 °C. Os componentes utilizados na reação estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes utilizados na reação de PCR para amplificação do gene codificador da LPMO.

Componentes	Volume
Taq DNA polimerase Platinum™ 5U/ul – Sigma - Aldrich	0,5µL
<i>Primer F</i> (25,0 pmol) (Sigma)	2,0 µL
<i>Primer R</i> (25,0 pmol) (Sigma)	2,0 µL

Buffer 10x	5,0 µL
DNTP (10 mM)	0,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
DNA total (100 ng/µL)	0,5 µL
Água ultrapura (q.s.p)	76,0 µL
Volume Final	50 µL

Os produtos da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), contendo brometo de etídio a uma concentração de 0,5 mg/µL. As imagens do gel foram documentadas por meio do Gel Doc 100, utilizando o software Image Lab version 6.0.1 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América).

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o "Kit Zymoclean Gel DNA Recovery" (Zymo Research)", seguindo as recomendações do fabricante, e quantificados por meio do aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific) e posteriormente digeridos com as enzimas de restrição do vetor específica para cada construção.

Em seguida os vetores foram submetidos a uma reação de restrição com as enzimas específicas para cada construção e desfosforilação com a FastAP "Thermosensitive Alkaline Phosphatase" (Thermo Fisher Scientific) e foram purificados utilizando o Kit "Zymoclean Gel DNA Recovery" (Zymo Research), seguindo para as reações de ligação com a enzima DNA ligase T4 (Thermo Fisher Scientific) a 16 °C durante 16 h.

2.3. Transformação em células competentes com as construções obtidas

A transformação por choque térmico foi realizada utilizando 50 µL de célula competente e 10 µL da ligação, que foram incubadas por 10 min no gelo, seguida por uma incubação a 42 °C por 90 segundos e novamente mantida em gelo por 2 min. Após o término da reação por choque térmico, foram adicionados 970 µL de meio

Luria Bertani (LB) (10 g/L de Triptona; 5 g/L de Extrato de Levedura; 10 g/L de NaCl) e mantidas sob agitação orbital de 200 rpm a 37 °C por 1 h e 30 min, a fim de propiciar o desenvolvimento das células transformadas. Após o término da incubação, foram aplicados 100 µL da cultura em placa de petri contendo meio LB sólido com canamicina (50 µg/mL⁻¹), e incubados novamente em B.O.D a 37 °C por 16 h.

Após as 16 h, metade de cada colônia isolada foi coletada com palito de dente estéril e submetidas a PCR de colônia para confirmação da clonagem. Para tal, os clones coletados foram depositados em microtubos contendo 15 µL de tampão de lise celular (KCl 50 mM, Tween 20 0,1% (v/v) e Tris-HCl 10 mM, pH 8,3) e submetidos a uma temperatura de 100 °C por 5 min, seguido de centrifugação a 13.000 x g por 10 min e coletado 2 µL do sobrenadante para a reação de PCR, a mesma descrita anteriormente e visualizados em gel de agarose 1% (p/v).

Após a confirmação da clonagem, a outra metade das colônias isoladas dos clones positivos foram inoculados em meio LB líquido contendo canamicina (50 µg/ml) e incubados a 37 °C por 16 h. Após a incubação, alíquotas contendo 800 µL da cultura foram estocadas em microtubos com glicerol (20% v/v), submetidas a congelamento rápido por nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

2.4. Ensaios de expressão e extração da proteína recombinante

Para realizar os ensaios de expressão, um clone positivo de cada construção foi retirado do estoque em glicerol e estriado em meio LB sólido suplementado com o antibiótico específico para cada vetor e as placas incubadas a 37 °C por 16 h. Após a incubação, uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio LB líquido contendo antibiótico e submetido a agitação a 200 rpm por 16 h a 37 °C para preparo do pré-inóculo, cujo 1% do volume foi inoculado em meio LB líquido, que permaneceu sob agitação a 200 rpm e 37 °C até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. Após atingir a fase logarítmica de crescimento, foram testadas diferentes concentrações de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM) para indução da expressão, e foram deixadas sob agitação por 6 h a 25 °C, 30 °C e 37 °C a 200 rpm, com alíquotas sendo coletadas a cada duas h e uma como controle, antes do IPTG ser adicionado. As cepas de *E.coli* utilizadas foram Lemo21 (DE3) (expressa com 0, 250, 500 e 1000

μ M de ramnose) (NEB, Ipswich, Massachusetts, EUA); C43 (DE3), WK6, BL21 (DE3) plysS e BL21(DE3).

Após os ensaios de expressão serem analisados e a melhor condição ser determinada para expressão em maior escala, o tempo final da cultura foi centrifugado a 1700 x g por 30 min a 4 °C e o “pellet” armazenado a -20 °C.

As culturas contendo as construções foram centrifugadas a 6400 x g (Sorvall RC5C; Kendro Lab Products, Ashville, NC, USA), 4 °C por 30 min, e o “pellet” foi ressuspensionado em tampão de extração 1 (Tabela 2) juntamente com 2 mg de lisozima e incubado por 1 h sem agitação e em banho de gelo. Após o tempo de incubação, a célula ressuspensionada foi submetida à sonicação por 10 min com pausas de 20 em 20 segundos. A seguir, a amostra foi centrifugada a 12000 x g por 20 min a 4° C. O sobrenadante foi coletado e chamado de 1º extrato e o “pellet” foi ressuspensionado novamente em 5 mL do tampão de extração e novamente sonicado. A amostra sonificada foi centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente e o sobrenadante foi coletado (2º extrato) e o “pellet” mais uma vez ressuspensionado com tampão de extração, com Triton x-100 (0,25% v/v), sonicado e centrifugado, nas mesmas condições anteriores, sendo o sobrenadante coletado e chamado de 3º extrato e o “pellet” final ressuspensionado em tampão de extração.

Após a extração, os extratos solúveis foram incubados por 1 h a 4 °C sob agitação com 3,5 ml de Ni²⁺–Resina NTA (Qiagen, Hilden, Alemanha), previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado na etapa de extração enzimática. Após a incubação, a amostra composta pela resina e extrato ligado foi submetida a um gradiente de imidazol de 20 mM a 1 M. A proteína de interesse foi eluída usando o mesmo tampão de extração contendo imidazol 500 mM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise das sequências

A análise *in silico* desempenha um papel fundamental na busca por novas enzimas, permitindo-nos adquirir informações sobre o comportamento dessas

moléculas em experimentos de laboratório, o que otimiza análises posteriores. Para confirmar a homologia das LPMOs prospectadas, as sequências de proteínas foram submetidas a uma análise de domínios conservados para identificar domínios referentes a família das LPMOs. Como é possível observar na Figura 2, as três LPMOs apresentaram domínios pertencentes a família AA10 (Atividades Auxiliares), que são capazes de degradar tanto a celulose quanto a quitina, desempenhando um papel muito importante na conversão da biomassa (Forsberg et al., 2011; Achmann et al., 2012). Em adição, as sequências das ORFs sc_151839 e LPMO_cons possuem um módulo de ligação a carboidratos (CBM 2), que são pequenos domínios proteicos não catalíticos que fazem parte de enzimas modulares, em particular enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) (Guillén et al., 2010).

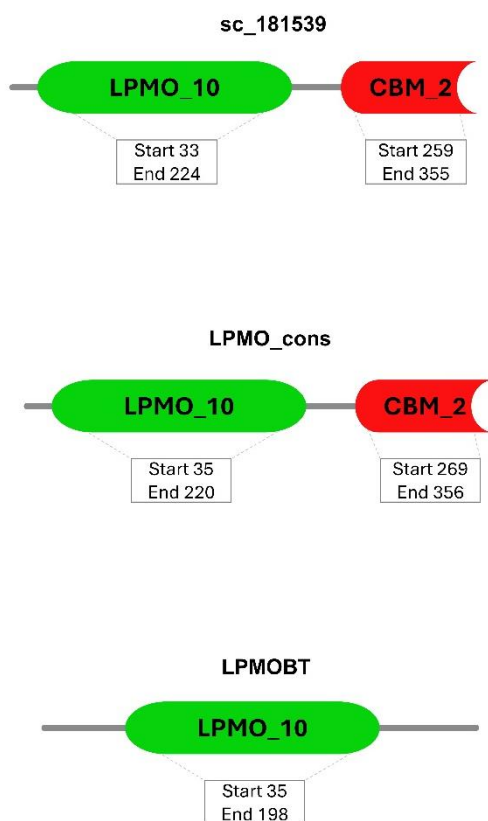


Figura 2. Esquema dos domínios da família LPMO 10, demonstrando em qual posição de aminoácido o domínio começa ("start") e termina ("end").

As LPMOs, assim como outras CAZymes, podem ser encontrados como enzimas simples ou com várias partes funcionais (modulares). É importante notar que

em enzimas multimodulares desse tipo, o domínio LPMO sempre está localizado na extremidade N-terminal, pois a presença de histidina nessa extremidade é fundamental para a ligação com o cobre, o que é essencial para sua atividade. No caso de LPMOs fúngicas da família AA9, pequenos domínios CBM1, responsáveis pela ligação à celulose (Mistry et al., 2021), são frequentemente encontrados ligados ao domínio catalítico. Por outro lado, ao examinar LPMOs bacterianas da família AA10, que atuam em substratos quitinosos e/ou celulósicos, observa-se maior diversidade em relação aos CBMs associados, geralmente incluindo CBMs das famílias 2, 3, 5, 10, 12 e 73 (Forsberg e Courtade, 2023; Mistry et al., 2021).

As sequências de aminoácidos das ORFs sc_181539, LPMO_cons e LPMOBT foram submetidas a uma análise de similaridade usando a ferramenta BLASTp do NCBI em relação ao banco de proteínas não redundantes (nr).

Os resultados revelaram que essas sequências compartilham significativas semelhanças com outras proteínas. A ORF sc_181539 apresentou 95% de cobertura e 77% de identidade e com uma LPMO de *Actinomadura madurae*, que possui um domínio de quitina (número de acesso WP_024934925.1). Além disso, LPMO_cons mostrou 97% de cobertura e 62% de identidade e com uma LPMO de *Cellulomonas* sp. (número de acesso WP_094179903.1) e LPMOBT 100% de cobertura e identidade com uma LPMO de *Bacillus* sp. (número de acesso WP_00742281.1).

Para uma avaliação mais ampla, também foram realizadas análises de similaridade com proteínas patenteadas usando a ferramenta BLASTp do NCBI. A LPMO sc_181539 apresentou 90% de cobertura e 60% de identidade com a patente US_7630836, que descreve uma LPMO degradadora de celulose (número de acesso ADC08293.1). A LPMO_cons, por sua vez, obteve 92% de cobertura e 55% de identidade com a patente US_9758802 (número de acesso AVA80589.1), enquanto LPMOBT apresentou 79% de cobertura e 62% de identidade contra a patente US_8377650 (número de acesso AGM72379.1). A análise de patentes é importante, pois permite verificar se as sequências escolhidas são semelhantes a sequências já patenteadas, o que poderia indicar a necessidade de reconsiderar a escolha, evitando duplicação de esforços.

Adicionalmente, foram feitas análises na base de dados Swissprot/Uniprot, conhecida por sua acuracidade. Nesse contexto, observamos uma cobertura de 96%

e 49% de identidade com uma LPMO de *Streptomyces ambofaciens*, uma enzima degradadora de celulose (número de acesso A3KKC4.1) para sc_181539. Além disso, houve 95% de cobertura e 31% de identidade com outra LPMO degradadora de celulose (número de acesso A3KKC4.1) para a LPMO_cons e 82% de cobertura e 55% de identidade com uma proteína de ligação (número de acesso Q8EHY2.2) para a LPMOBT.

Essas análises fornecem informações essenciais sobre as semelhanças das sequências com proteínas conhecidas e mostram que são LPMOs não caracterizadas, ajudando a orientar o processo de seleção e estudo das enzimas em questão.

As análises feitas através de ferramentas de bioinformática, desde a análise de identidade com os bancos de dados disponíveis até modelagem tridimensional da proteína são de extrema importância para uma caracterização confiável da potencial nova enzima aqui estudada. Sendo assim, além dos dados obtidos acima, as informações gerais LPMOs, como massa molecular, pI (ponto isoelétrico) e outras, também foram exploradas (Tabela 2). Essas informações foram importantes para os passos seguintes de expressão, extração e purificação, bem como para identificação da banda de interesse durante a visualização em gel de poliacrilamida.

Tabela 2. Características gerais das proteínas sc_181539, LPMO_cons e LPMOBT, pelo “Protparam” (<http://web.expasy.org/protparam/>).

	sc_181539	LPMO_cons	LPMOBT
Aminoácidos	356	322	187
Massa molecular (KDa)	37	33	20
Ponto Isoelétrico (pI)	5.21	5.07	7.94

As análises pelo SignalP mostraram que as três sequências possuíam peptídeo sinal na região N-terminal (Figura 3). Esta região foi excluída ao proceder com o

O resultado no TMHMM Server v. 2.0 mostrou que as três proteínas apresentam uma porção N-terminal transmembrana (Figura 4), no entanto essa porção de aminoácidos também é referente ao peptídeo sinal, que foi clivado, portando não é uma proteína de membrana, uma informação importante para saber quais protocolos de extração utilizar, visto que proteínas de membrana são mais difíceis de obter em sua forma solúvel e nativa, pois está fortemente ligada à membrana e possuem caráter hidrofóbico, sendo necessário para sua extração o uso de agentes desnaturantes, como por exemplo, ureia e guanidina, e uso de surfactantes (Jamshad et al., 2015).

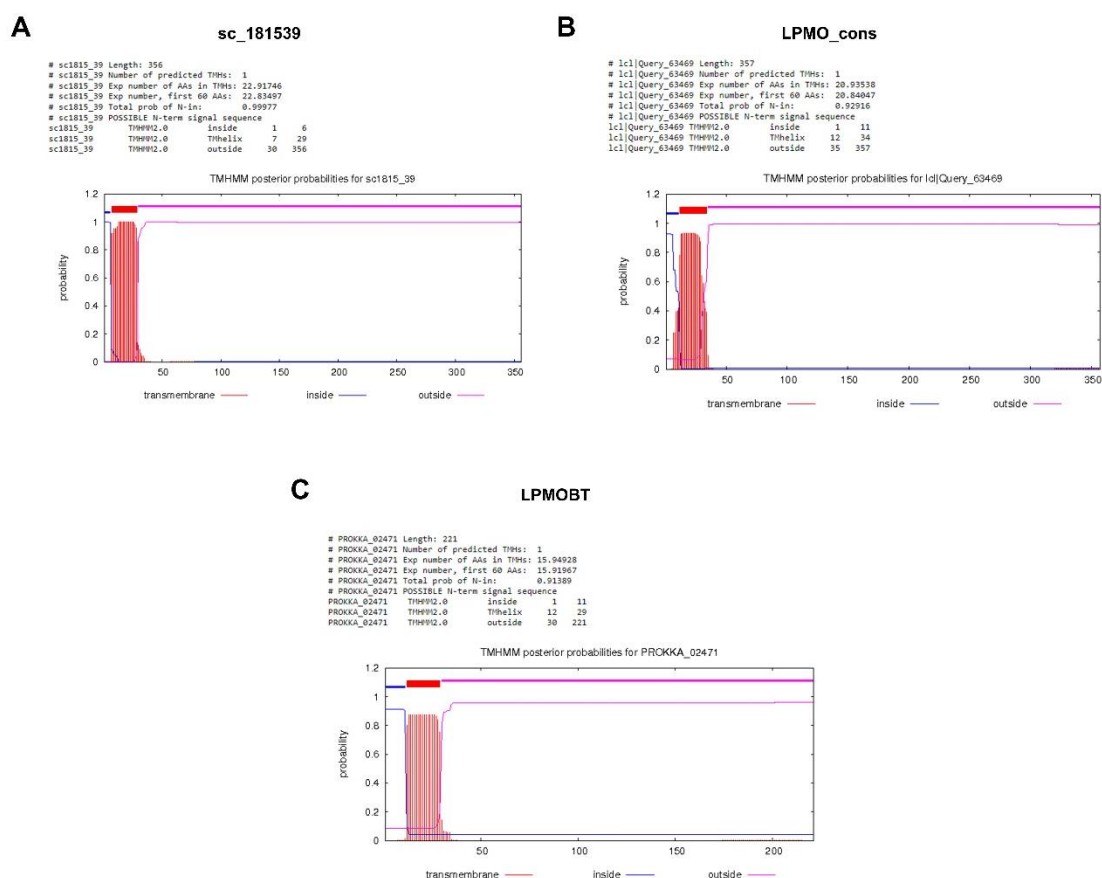


Figura 4. Análise pela plataforma “online” TMHMM Server v. 2.0 das sequências sc_181539, LPMO_cons e LPMOBT, demonstrando uma porção transmembrana na região N-terminal nas três sequências.

3.2. Amplificação e clonagem das ORFs

As sequências das ORFs oriundas do metagenoma do consórcio degradador de biomassa (LPMO_cons) e do genoma de *B. thurigiensis* (LPMOBT) foram amplificadas com seus primers específicos para posterior realização da clonagem e

expressão das proteínas. A amplificação dos genes produziu fragmentos de DNA com tamanhos que coincidiam com o tamanho esperado em pares de bases para cada uma das sequências codificadoras de proteínas (ORFs) (Figura 5).

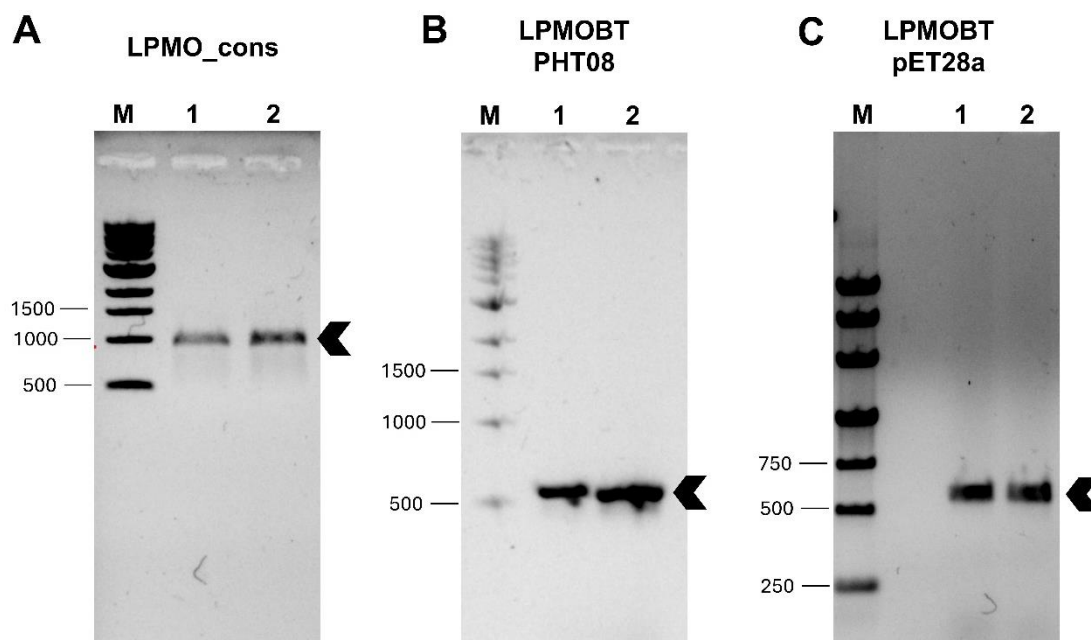


Figura 5. Eletroferograma dos fragmentos de interesse a partir do DNA genômico e metagenômico. A: Amplificação do gene LPMO_cons a partir do DNA metagenômico do consórcio degradador de biomassa. B: Amplificação do gene LPMOBT a partir do DNA genômico de *B. thuringiensis* no vetor PHT08. C: Amplificação do gene LPMOBT a partir do DNA genômico de *B. thuringiensis* no vetor pET28a.

Uma vez obtidos os fragmentos, estes foram clivados com as enzimas de restrição correspondentes a cada vetor, e os produtos de clivagem (insertos) foram utilizados para a ligação em seus respectivos vetores e posteriormente foram transformados em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) e C43, onde as colônias foram analisadas por PCR utilizando os respectivos primers de cada construção. A partir da análise em gel de agarose foi possível verificar quais clones foram amplificados, indicando a presença do inserto (Figura 6). Para a construção pET28-LPMO_cons em BL21 (DE3), sete clones, dos dez coletados, foram positivos, sendo os clones 1, 2, 3, 6, 7, 8 e 10. Para a construção pET28a-LPMOBT, em C43, apenas

duas colônias foram coletadas, sendo uma positiva, enquanto para a construção PHT08-LPMOBT, em BL21(DE3), os nove clones coletados foram positivos.

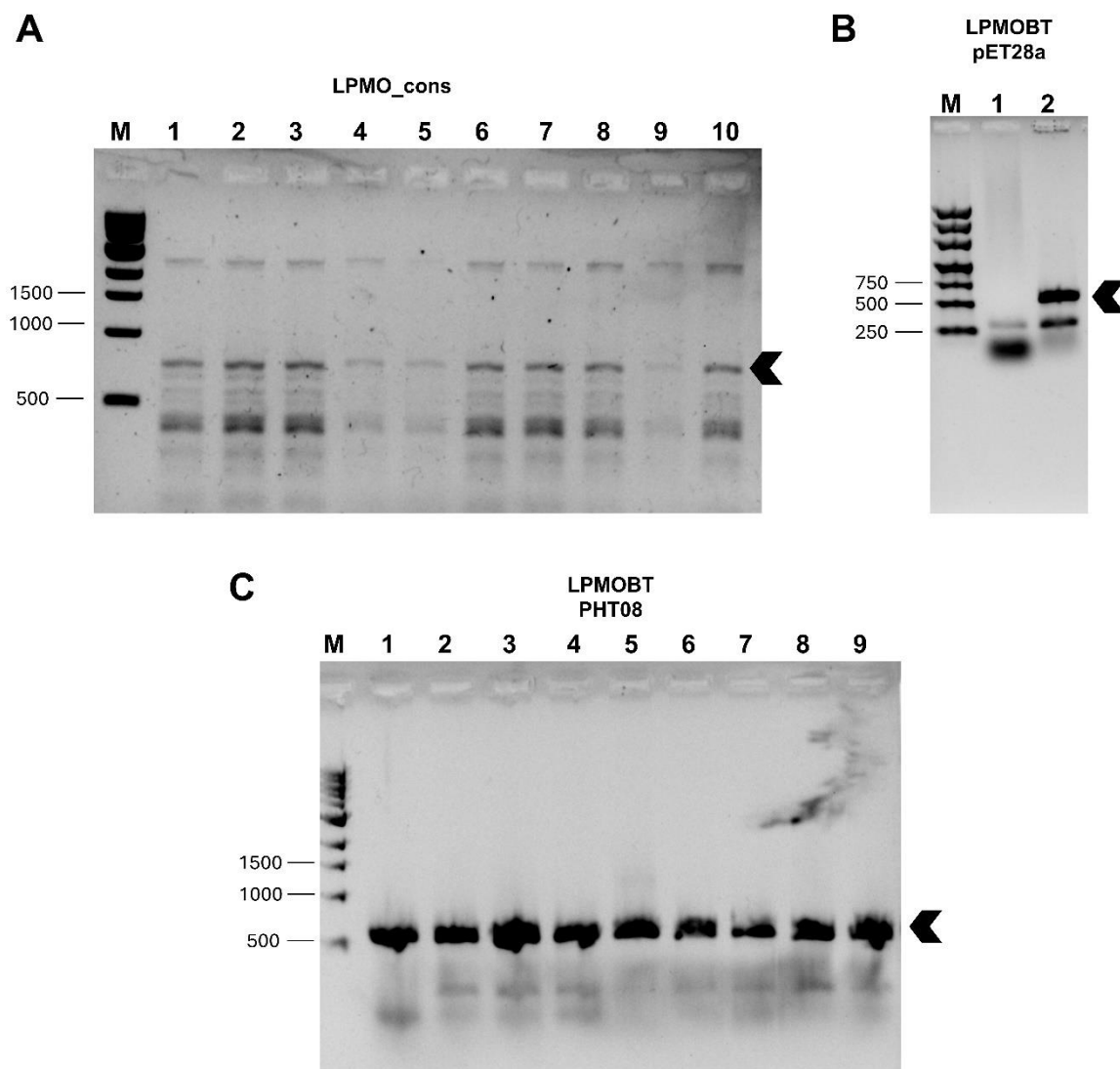


Figura 6. Eletroferograma da amplificação dos clones por PCR de colônia para confirmação da clonagem.

A empresa GenOne sintetizou a LPMO prospectada a partir do metagenoma da torta de filtro, uma vez que a extração do DNA metagenômico não era viável, sendo entregue o gene ligado ao vetor pET24a, e a construção denominada pET24a-sc151839.

3.3. Expressão e purificação enzimática

A construção pET24a-sc_151839 transformada em *E.coli* BL21(DE3) foi inicialmente submetida a expressão com 0,1 mM e 1 mM de IPTG a 30 °C e 37 °C e com 0,5 mM de IPTG a 37 °C por 24 h em meio LB, onde foram coletadas alíquotas de duas em duas h pelas primeiras seis h e uma alíquota final em 24 h, bem como um controle antes da adição de IPTG (T0). A proteína não teve uma expressão significativa em nenhuma das condições (Figura 7).

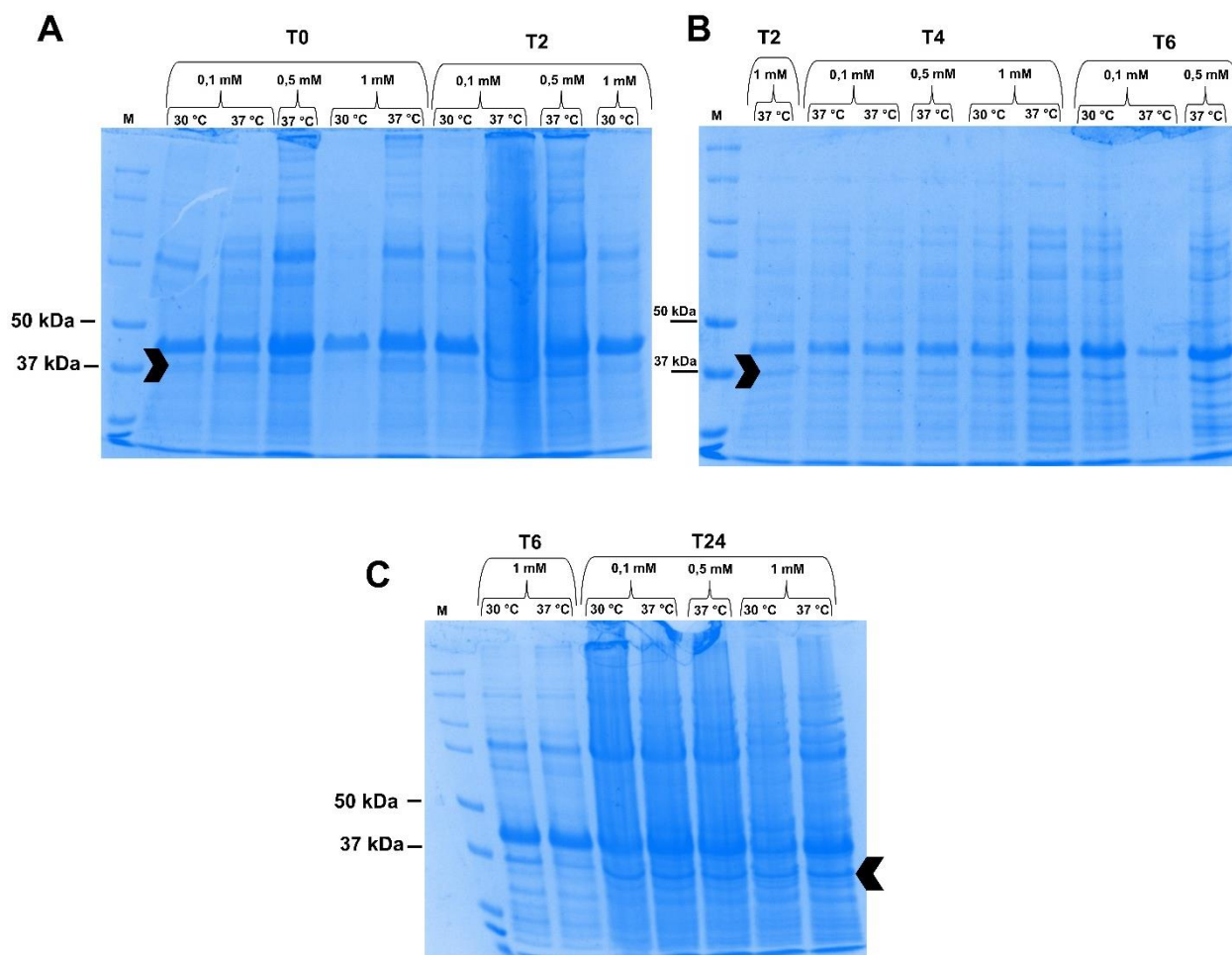


Figura 7. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 12%) revelando a expressão da construção pET24a-sc_151839 em *E. coli* BL21(DE3) a 30 e 37 °C com diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5 e 1 mM). (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (T0) - Extrato celular sem indução; (T2) - Extrato celular com duas h de indução; (T4) - Extrato celular com quatro h de indução; (T6) - Extrato celular com seis h de indução; (T24) - Extrato celular com 24 h de indução.

Posteriormente, o plasmídeo recombinante foi expresso a 25 °C com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG e na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) plysS, porém ambos sem sucesso (dados não mostrados). Com o objetivo de testar a expressão da LPMO sc_181539, ela foi transformada em células competentes de *E. coli* C43 e Arctic, e expressas a 30 °C com 1 mM de IPTG por quatro horas (Figura 8), e foi possível observar expressão da enzima nas duas células em duas e quatro horas. Sendo assim, a LPMO sc_181539 transformada em C43 foi cultivada em maior volume, expressa nas mesmas condições e por seis horas.

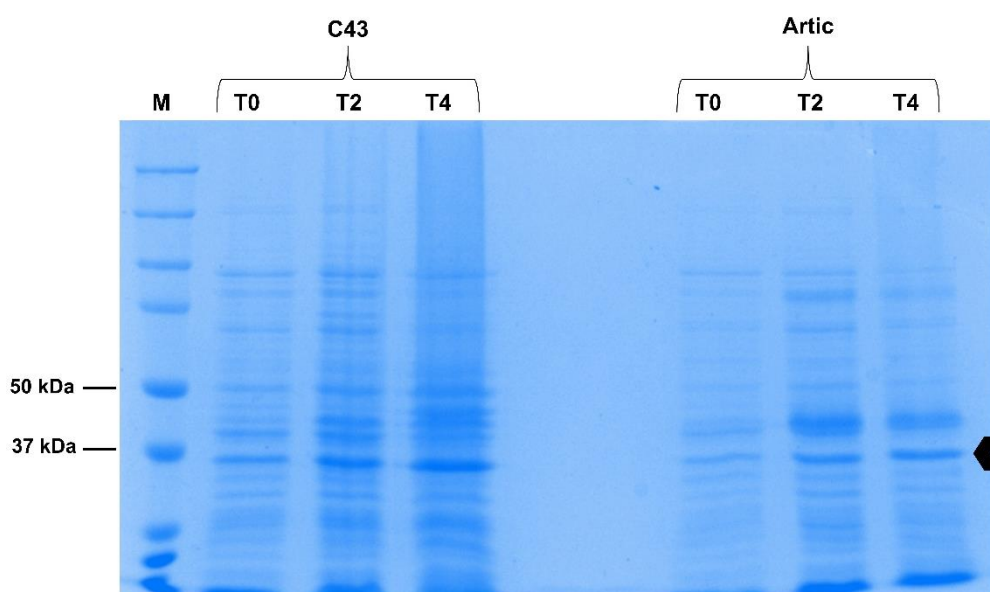


Figura 8. DS-PAGE (gel de poliacrilamida a 12%) revelando a expressão da construção pET24a-sc_151839 em *E. coli* C43 (DE3) e Arctic. (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (T0) Extrato celular sem indução; (T2) Extrato celular com duas h de indução; (T4) Extrato celular com quatro h de indução.

As células foram submetidas a extração na tentativa de se obter a proteína em sua fração solúvel, bem como a purificação de afinidade com metal com diferentes concentrações de imidazol. Porém, como pode ser observado na figura 9, a

purificação não foi eficiente, uma vez que é possível observar, em 200 mM, uma banda fraca e acima do tamanho da enzima de 37 KDa.

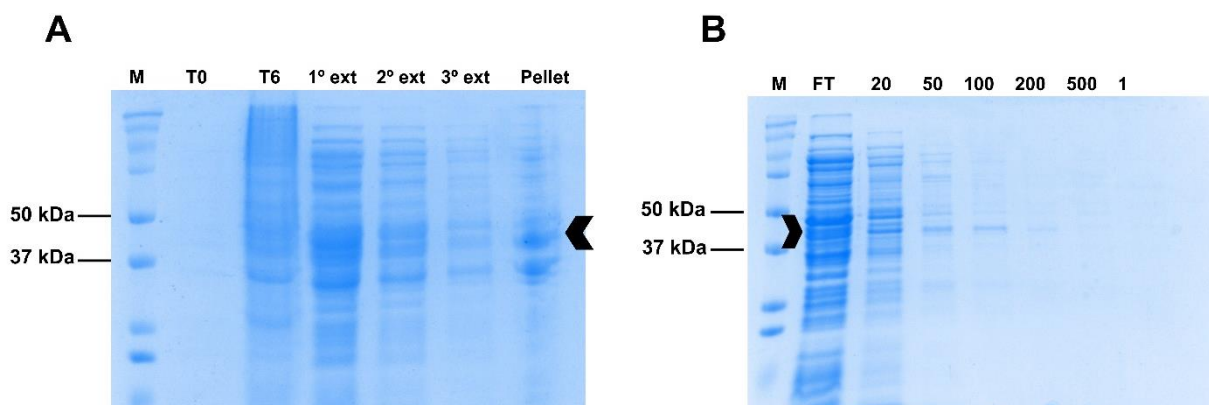


Figura 9. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 12%) revelando a extração (A) e purificação (B) da construção pET24a-sc_151839 em *E.coli* BL21 C43. (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (T0) - Extrato celular sem indução; (T6) - Extrato celular com seis h de indução; (1° ext) - 1° extrato da extração; (2° ext) - 2° extrato da extração; (3° ext) - 3° extrato da extração; (FT) - Proteínas não ligadas na coluna de Ni-NTA – “Flow Through”; (20 a 1) - Proteínas eluídas nas diferentes concentrações de imidazol, com 20 mM até 1 M.

Após as tentativas iniciais de expressão utilizando a LPMO prospectada do metagenoma da torta de filtro, realizou-se uma prospecção adicional de LPMOs no metagenoma de um consórcio degradador de biomassa. Inicialmente, essa busca visou identificar semelhanças com LPMOs já conhecidas, resultando na identificação de 42 ORFs candidatas à codificação da enzima de interesse. Em seguida, as ORFs foram submetidas a uma triagem com base na presença de domínios de LPMO e em comparações com bancos de dados, o que culminou na identificação de seis sequências que codificam a referida enzima. Dentre as seis as sequências, foi escolhida uma para a clonagem e os ensaios de expressão. Esta construção, chamada pET28a-LPMO_cons, foi transformada em células competentes de *E.coli* BL21(DE3), C43 e WK6 e submetida a expressão com 1 mM de IPTG a 37 °C overnight e não teve nenhuma expressão significativa.

A LPMOBT, prospectada do genoma da bactéria *Bacillus Thuriensis* foi clonada nos vetores pET28a+ (pET28a-LPMOBT) e PHT08 (PHT08-LPMOBT). A

primeira foi transformada em células competentes de *E.coli* BL21(DE3) e C43, enquanto a segunda somente em BL21(DE3) e submetidas a ensaios de expressão. Primeiramente, a construção pET28a-LPMOBT em C43 foi expressa a 37 °C com 0,1 mM e 1 mM de IPTG por seis horas e em BL21(DE3) também a 37 °C e 1 mM de IPTG. Como é possível visualizar na figura 10, não houve expressão em nenhuma das células.

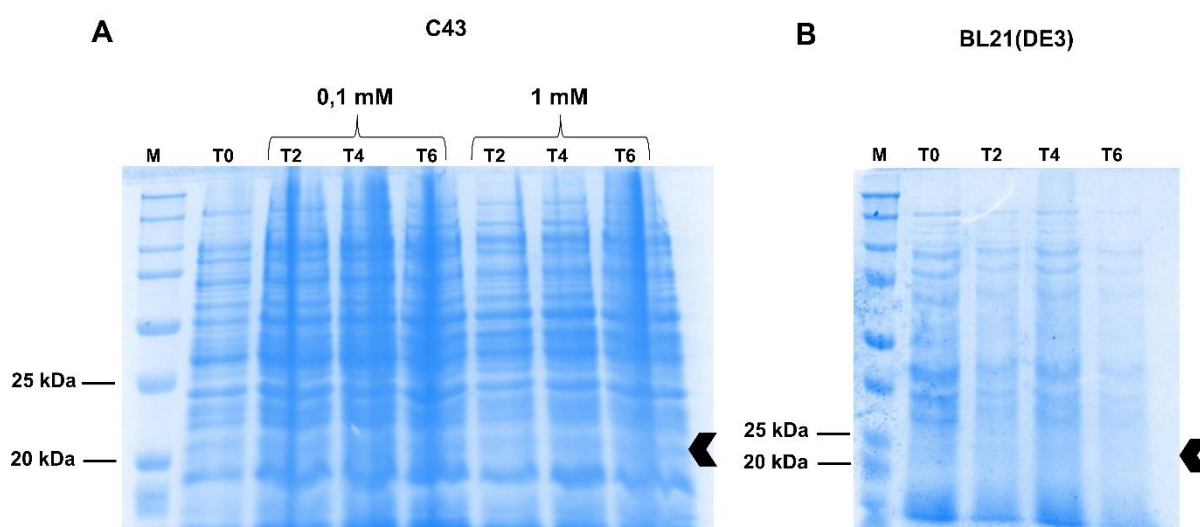


Figura 10. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 12%) revelando a expressão da construção pET28a-LPMOBT em *E.coli* BL21 C43 e BL21 (DE3). (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (T0) Extrato celular sem indução; (T2) Extrato celular com duas h de indução; (T4) Extrato celular com quatro h de indução; (T6) Extrato celular com seis h de indução.

A construção PHT08-LPMOBT foi expressa a 37 °C, com 1 mM de IPTG por seis horas e coletadas alíquotas de duas em duas horas, bem como um controle antes da adição de IPTG. Na figura 11 é possível observar expressão da enzima a partir de duas horas, sendo que o último tempo coletado foi o que mais apresentou maior nível de expressão. Sendo assim, o clone foi então cultivado em maior volume para obtenção da enzima em sua fração solúvel, porém ela ficou retida nos corpos de inclusão (dados não mostrados).

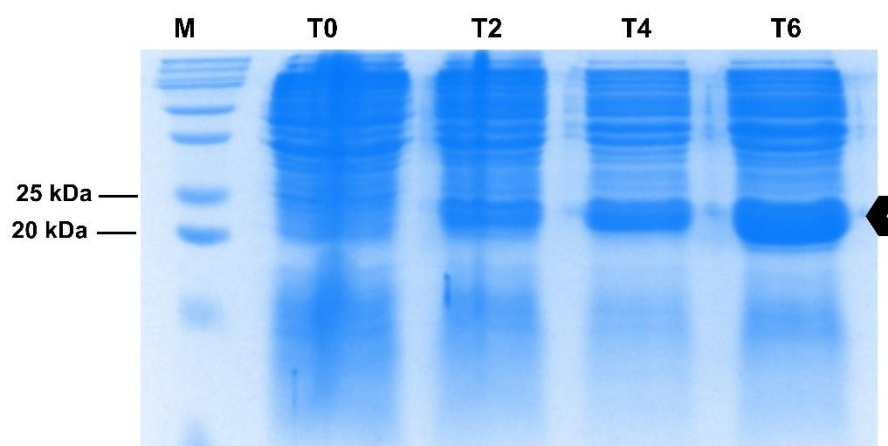


Figura 11. SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 12%) revelando a expressão da construção PHT08-LPMOBT em *E.coli* BL21(DE3). (M) - Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad); (T0) Extrato celular sem indução; (T2) Extrato celular com duas h de indução; (T4) Extrato celular com quatro h de indução; (T6) Extrato celular com seis h de indução.

Apesar das inúmeras tentativas de expressão das LPMOs prospectadas em diferentes concentrações de IPTG, temperatura e cepas de células competentes não foi obtido êxito nos ensaios, porém outras tentativas de expressão e extração específicas para LPMOs são válidos, uma vez que esta enzima apresenta muitas particularidades para sua obtenção.

4. REFERÊNCIAS

- Aachmann, F. L., Sørlie, M., Skjåk-Bræk, G., Eijsink, V. G. H. & Vaaje-Kolstad, G. (2012). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 18779–18784.
- Constancio, M. T. L., Sacco, L. P., Campanharo, J. C., Castellane, T. C. L., de Oliveira Souza, A. C., Weiss, B., de Mello Varani, A. & Alves, L. M. C. (2020). *Curr Microbiol* **77**, 3114–3124.
- Eijsink, V. G. H., Petrovic, D., Forsberg, Z., Mekasha, S., Røhr, Å. K., Várnai, A., Bissaro, B. & Vaaje-Kolstad, G. (2019a). *Biotechnology for Biofuels* **12**, 58.
- Eijsink, V. G. H., Petrovic, D., Forsberg, Z., Mekasha, S., Røhr, Å. K., Várnai, A., Bissaro, B. & Vaaje-Kolstad, G. (2019b). *Biotechnol Biofuels* **12**, 58.
- Forsberg, Z. & Courtade, G. (2023). *Essays in Biochemistry* **67**, 561–574.
- Forsberg, Z., Mackenzie, A. K., Sørlie, M., Røhr, Å. K., Helland, R., Arvai, A. S., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2014). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 8446–8451.
- Forsberg, Z., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Bunæs, A. C., Stenstrøm, Y., MacKenzie, A., Sørlie, M., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. H. (2011). *Protein Science* **20**, 1479–1483.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). Vol. *The Proteomics Protocols Handbook*, edited by J. M. Walker. pp. 571–607. Totowa, NJ: Humana Press.
- Guillén, D., Sánchez, S. & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1241–1249.
- Harris, P. V., Xu, F., Kreel, N. E., Kang, C. & Fukuyama, S. (2014). *Current Opinion in Chemical Biology* **19**, 162–170.
- Hemsworth, G. R., Henrissat, B., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2014). *Nat Chem Biol* **10**, 122–126.
- Jamshad, M., Grimard, V., Idini, I., Knowles, T. J., Dowle, M. R., Schofield, N., Sridhar, P., Lin, Y., Finka, R., Wheatley, M., Thomas, O. R. T., Palmer, R. E., Overduin, M., Govaerts, C., Ruysschaert, J.-M., Edler, K. J. & Dafforn, T. R. (2015). *Nano Res.* **8**, 774–789.
- Johansen, K. S. (2016). *Biochemical Society Transactions* **44**, 143–149.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. L. (2001). *Journal of Molecular Biology* **305**, 567–580.

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2013). *Biotechnology for Biofuels* **6**, 41.

Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D. & Bateman, A. (2021). *Nucleic Acids Research* **49**, D412–D419.

Nielsen, H. (2017). Vol. *Protein Function Prediction: Methods and Protocols*, edited by D. Kihara. pp. 59–73. New York, NY: Springer.

Omori, W. P., Pinheiro, D. G., Kishi, L. T., Fernandes, C. C., Fernandes, G. C., Gomes-Pepe, E. S., Pavani, C. D., Lemos, E. G. D. M. & Souza, J. A. M. D. (2019). *Genet. Mol. Biol.* **42**, 145–150.

Sannigrahi, P., Ragauskas, A. J. & Tuskan, G. A. (2010). *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **4**, 209–226.

Villares, A., Moreau, C., Bennati-Granier, C., Garajova, S., Foucat, L., Falourd, X., Saake, B., Berrin, J.-G. & Cathala, B. (2017). *Sci Rep* **7**, 40262.

Vu, V. V., Beeson, W. T., Span, E. A., Farquhar, E. R. & Marletta, M. A. (2014). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 13822–13827.

Wang, S.-N., Chen, Q.-J., Zhu, M.-J., Xue, F.-Y., Li, W.-C., Zhao, T.-J., Li, G.-D. & Zhang, G.-Q. (2018). *Biochimie* **148**, 46–54.