



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

TALLYTA SANTOS TEIXEIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE DE MONO-OXIGENASES LÍTICAS DE
POLISSACARÍDEOS (LPMOs) EM SUBSTRATOS CELULÓSICOS POR
ESPECTROMERIA DE MASSAS**

**GURUPI – TO
2018**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

TALLYTA SANTOS TEIXEIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE DE MONO-OXIGENASES LÍTICAS DE
POLISSACARÍDEOS (LPMOs) EM SUBSTRATOS CELULÓSICOS POR
ESPECTROMERIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira

Co-orientadora: Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur

**GURUPI – TO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

T266e Teixeira, Tallyta Santos.

Estudo da atividade de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) em substratos celulósicos por espectrometria de massas. / Tallyta Santos Teixeira. – Gurupi, TO, 2018.

122 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2018.

Orientador: Félix Gonçalves de Siqueira

Coorientadora : Patrícia Verardi Abdelnur

1. LPMO de *Thermobifida fusca* (TfAA10). 2. MALDI-TOF MS e UHPLC-ESI-MS. 3. Oligossacarídeos. 4. Hidrólise enzimática. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



TALLYTA SANTOS TEIXEIRA

Estudo da atividade de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) em substratos celulósicos por espectrometria de massas.

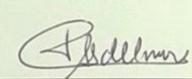
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 26/02/2018 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 26/02/2018.

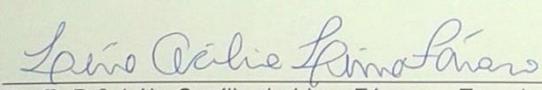
Banca Examinadora:



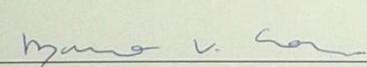
Prof. Dr. Félix Gonçalves de Siqueira – Orientador - Embrapa



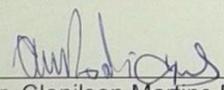
Profª. Drª. Patrícia Verardi Abdelnur – Coorientadora - Embrapa



Profª. Drª. Léia Cecília de Lima Fávaro – Examinadora - Embrapa



Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia – Examinador - UnB



Prof. Dr. Clenilson Martins Rodrigues – Examinador - Embrapa

Brasília (DF),
2018.

DICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser luz e fortaleza em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Ademildo e Dinalva, pelo amor incondicional e incentivo aos estudos. Aos meus irmãos, Kennya, Kevynn e Thatyelle, pela amizade, cumplicidade e compreensão. Aos meus avós Salomão (*in memória*) e Oriza pelos conselhos, carinho e apoio.

A todos os professores do ensino Fundamental e Médio, em especial ao Luís Carlos, Umberto e Marcelo por sempre me incentivarem, motivarem e ensinarem lições além da sala de aula. Aos meus professores da graduação, em especial aos meus orientadores Luiz Gustavo de Lima Guimarães, Aurenívea Bonifácio, Gil Rodrigues, Satuf, Sindélia Freitas Azzoni, Carla Portella, Aline Gomes Tavares e Alex Fernando de Almeida pelos conselhos e ensinamentos na pesquisa e na vida.

Aos meus orientadores Dr. Félix Gonçalves de Siqueira e Dra. Patrícia Verardi Abdelnur por serem verdadeiros exemplos de mestres e profissionais, não medindo esforços para me ensinar e aconselhar. Agradeço também pela confiança e amizade, e principalmente pela constante demonstração de sabedoria e de humildade.

Às minhas amigas Renata, Ryhára, Raiana, Rayssa, Débora, Ludmilla e Tonia por me incentivarem, mesmo estando longe. E também aos amigos que fiz durante essa jornada de mestrado, em especial à Fernanda, Taís, Gleiciane, Valquíria, Patrícia, Antoniella, Vivianny, Elisa, Vannia, Carla, Carol, Samira, Mariana, Brenda e Alcina, por toda amizade, carinho, conselhos e momentos de lazer e de discussões.

A todos do Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB), em especial à Dra. Kelly Barreto, MSc. Gisele Soares e a Dra. Léia Fávaro e a todos do Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB), em especial a MSc. Thais Demarchi, MSc. Thályta Pacheco, Dra. Amanda Souza e Dra. Dasciana Rodrigues, pela prestatividade e colaboração na realização do projeto, além da amizade e ensinamentos.

A todos do Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis (LQB), em especial aos analistas Patrícia Kalil, José Antônio e Raquel Campanha pela dedicação e paciência ao repassar seus conhecimentos práticos.

Aos meus amigos do Grupo de Espectrometria de massas: Jéssica Macêdo, Natália, Vinícius, Flávia, Christiane, Jorge e Diana, pela troca de experiências, discussões, incentivo e cumplicidade que foram essenciais para a minha formação e para a realização deste trabalho.

E também aos amigos do Grupo Macrofungos e Enzimas, em especial ao Elias Silva e Aparecido pela amizade e partilha de conhecimento.

À banca por prontamente aceitar dedicar seu tempo e contribuir com esse trabalho.

À Embrapa, pelo suporte financeiro (Projeto UPZYME – Código 02.12.11.003.00.00).

À Embrapa Agroenergia, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à Universidade Federal do Tocantins, pelo apoio técnico, científico e acadêmico.

A todos os colaboradores da Embrapa Agroenergia do SGP, NTI, SGL e CLP e também ao secretário e coordenador do programa de pós-graduação, Jediel Fernandes Oliveira e Gessiel Newton Scheidt, por todo suporte dado com real prestatividade e rapidez durante toda a realização do mestrado em Gurupi-Brasília.

Agradeço também a todos aqueles que me incentivaram e apoiaram diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

As mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) são enzimas acessórias que auxiliam a ação de enzimas hidrolíticas na desconstrução da parede celular vegetal. O sinergismo dessas enzimas facilita a obtenção de monômeros de açúcares que são fundamentais para o metabolismo microbiano e para processos industriais. A caracterização das LPMOs é desafiadora, pois ela atua na celulose e em outros polissacarídeos através de clivagem oxidativa, resultando em diferentes tipos de oligômeros. Por isso, se faz necessário utilizar técnicas analíticas avançadas como a espectrometria de massas que permite a identificação de compostos químicos a partir da relação m/z (massa-carga). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação da LPMO de *Thermobifida fusca* (TfAA10) recombinante em substratos celulósicos por espectrometria de massas. Duas construções gênicas foram avaliadas quanto à atividade de LPMO: 1) TfAA10-O (com códon otimizado) e 2) TfAA10-N (com códon nativo), sendo expressas em *Xanthanomonas phaffii* (*Pichia pastoris*). A TfAA10-O foi produzida em *erlenmeyer* (250 mL), enquanto que a TfAA10-N em *erlenmeyer* (250 mL) e biorreator (1 L). Os perfis destas enzimas foram analisados por MALDI-TOF MS, empregando ácido sinapílico e modo linear positivo, no qual observou duas isoformas, ou seja, duas proteínas que a partir da mesma sequência, possuem tamanhos moleculares diferentes (27 e 24 kDa). As atividades das LPMOs foram avaliadas em substratos celulósicos (Avicel PH101 e PASC), tendo o ácido ascórbico como doador de elétrons, e controles na presença e ausência de enzima e/ou ácido ascórbico. As condições reacionais e os métodos analíticos foram otimizados para permitir a análise dos produtos da reação enzimática. Dentre as condições reacionais avaliadas tem-se: tampões, concentrações de enzima e de ácido ascórbico, agitação, forma de purificação e substrato. O método analítico por MALDI-TOF MS foi otimizado quanto aos parâmetros instrumentais e ao método de preparo da amostra, já o método LC-MS foi desenvolvido com base na literatura e otimizado com padrões de oligossacarídeos. Mesmo após a otimização dos métodos, em nenhuma das condições testadas foi possível detectar oligossacarídeos oxidados que confirmem a ação das LPMOs estudadas. Apesar disso, diversas informações foram relevantes para o estudo da ação dessas enzimas. Quanto as condições reacionais, os tampões de potássio se mostraram inviáveis para análises de hidrólise de LPMOs pela possibilidade de gerar falso-positivos, sendo indicados nestes casos os tampões de amônio ou sódio. Nas análises por MALDI-TOF MS, a adição de cloreto de sódio se mostrou adequada por permitir maior intensidade dos oligossacarídeos e também evitar a interpretação errônea de oligossacarídeos oxidados sodiados e não oxidados potassidados, que possuem mesmo valor m/z . O *dopping* de amostras contendo íons duvidosos com sais de lítio, potássio e/ou sódio podem auxiliar a revelar a identidade desses íons, permitindo verificar a presença de oligossacarídeos oxidados, em baixa concentração pela ação do ácido ascórbico, evidenciando assim a necessidade dos controles. A TfAA10-N produzida em biorreator apresentou oligossacarídeos nativos com menor grau de polimerização (DP2-DP4) ao longo dos tempos reacionais, nos tampões de acetato e de fosfato de sódio. Esse resultado foi observado em ensaios na presença da enzima (com e sem ácido ascórbico), quando analisada pelos dois métodos analíticos, sugerindo uma ação hidrolítica nas condições testadas. O método MALDI-TOF MS permitiu a análise de oligossacarídeos com maior grau de polimerização (DP3-DP9), enquanto o método UHPLC-ESI-MS mostrou adequado para oligossacarídeos menores (DP1-DP4) e também para análises de amostras mais complexas. Dessa forma, os métodos analíticos se mostraram ser complementares para a caracterização das LPMOs, podendo assim auxiliar no direcionamento das aplicações desta enzima. E este estudo mostrou que a TfAA10A expressa em *K. phaffii* não apresenta atividade em celulose (Avicel e PASC) provavelmente devido ao padrão de glicosilação que esta apresenta. Apenas oligossacarídeos nativos foram detectados, que podem estar relacionados à clivagem interna, mas que não são suficientes para comprovar a ação desta LPMO.

Palavras-chave: LPMO de *Thermobifida fusca* (TfAA10); MALDI-TOF MS; UHPLC-ESI-MS; oligossacarídeos; hidrólise enzimática

ABSTRACT

The lytic polysaccharides monoxygenases (LPMOs) are accessory enzymes that help the action of hydrolytic enzymes in the deconstruction of the plant cell wall. The synergism of these enzymes facilitates the obtaining of sugar monomers that are fundamental for microbial metabolism and for industrial processes. The characterization of LPMOs is challenging, since it acts on cellulose and other polysaccharides through oxidative cleavage, resulting in different types of oligomers. Therefore, it is necessary to use advanced analytical techniques such as mass spectrometry that allows the identification of chemical compounds from the m/z ratio (mass-charge). Thus, this work had as objective to evaluate the action of the LPMO of *Thermobifida fusca* (TfAA10) recombinant in cellulosic substrates by mass spectrometry. Two gene constructs were evaluated for LPMO activity: 1) TfAA10-O (with optimized codon) and 2) TfAA10-N (with native codon), being expressed in *Xhomagatella phaffii* (*Pichia pastoris*). TfAA10-O was produced in *Erlenmeyer* (250 mL), while the TfAA10-N in *Erlenmeyer* (250 mL) and bioreactor (1 L). The profiles of these enzymes were analyzed by MALDI-TOF MS, using synapyllic acid and positive linear mode, in which two isoforms were observed, that is, two proteins that from the same sequence have different molecular sizes (27 and 24 kDa). The activities of the LPMOs were evaluated on cellulosic substrates (Avicel PH101 and PASC), having ascorbic acid as an electron donor, and controls in the presence and absence of enzyme and/or ascorbic acid. The reaction conditions and the analytical methods were optimized to allow the analysis of the products of the enzymatic reaction. Among the reaction conditions evaluated are: buffers, enzyme and ascorbic acid concentrations, agitation, purification form and substrate. The analytical method by MALDI-TOF MS was optimized for the instrumental parameters and the sample preparation method, since the LC-MS method was developed based on the literature and optimized with oligosaccharide standards. Even after the optimization of the methods, in none of the conditions tested was it possible to detect oxidized oligosaccharides that confirm the action of the LPMOs studied. Despite this, several pieces of information were relevant to the study of the action of these enzymes. Regarding the reaction conditions, potassium buffers were not feasible for hydrolysis analysis of LPMOs due to the possibility of generating false positives. In these cases, ammonium or sodium buffers were indicated. In the MALDI-TOF MS analyzes, the addition of sodium chloride was adequate to allow a greater intensity of the oligosaccharides and also to avoid the erroneous interpretation of potassium oxidized sodium and non-oxidized oligosaccharides, which have the same m/z value. Doping of samples containing lithium, potassium and / or sodium salts may help to reveal the identity of these ions, allowing the presence of oxidized oligosaccharides in low concentration by the action of ascorbic acid, thus evidencing the necessity of the controls. TfAA10-N produced in bioreactor showed native oligosaccharides with lower degree of polymerization (DP2-DP4) throughout the reaction times, in acetate and sodium phosphate buffers. This result was observed in the presence of the enzyme (with and without ascorbic acid), when analyzed by the two analytical methods, suggesting a hydrolytic action under the conditions tested. The MALDI-TOF MS method allowed the analysis of oligosaccharides with a higher degree of polymerization (DP3-DP9), while the UHPLC-ESI-MS method showed adequate for smaller oligosaccharides (DP1-DP4) and also for more complex sample analyzes. Thus, the analytical methods were shown to be complementary for the characterization of LPMOs, which may help to guide the applications of this enzyme. And this study showed that the TfAA10A expressed in *K. phaffii* shows no activity in cellulose (Avicel and PASC) probably due to the glycosylation pattern that it presents. Only native oligosaccharides were detected, which may be related to internal cleavage, but are not sufficient to prove the action of this LPMO.

Keywords: *Thermobifida fusca* LPMO (TfAA10); MALDI-TOF MS; UHPLC-ESI-MS; oligosaccharides; enzymatic hydrolysis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	BIORREFINARIA DE BIOMASSAS VEGETAIS	19
3.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	20
3.3	DESCONSTRUÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL	23
3.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	24
3.5	MONO-OXIGENASES LÍTICAS DE POLISSACARÍDEOS (LPMOS)	26
3.5.1	<i>Descoberta e características gerais</i>	26
3.5.2	<i>Mecanismo de ação</i>	28
3.5.3	<i>LPMO de Thermobifida fusca</i>	30
3.5.4	<i>Caracterização da atividade de LPMOs</i>	32
3.6	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	33
3.6.1	<i>Espectrometria de massas aplicada à caracterização da atividade de LPMOs</i>	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	39
4.2	ENZIMAS LPMO	40
4.2.1	<i>Produção de enzimas</i>	40
4.2.2	<i>Preparo das enzimas para os ensaios enzimáticos</i>	40
4.2.3	<i>Determinação da quantidade de proteínas</i>	41
4.3	PREPARO DO SUBSTRATO CELULÓSICO	42
4.4	ENSAIOS ENZIMÁTICOS	42
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	44
4.5.1	<i>Análise das enzimas por MALDI-TOF MS</i>	44
4.5.2	<i>Análise dos produtos da reação enzimática</i>	44
4.5.2.1	<i>Método analítico baseado em MALDI-TOF MS</i>	44
4.5.2.2	<i>Método analítico baseado em UHPLC-ESI-MS</i>	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	ANÁLISE DO PERFIL DAS PROTEÍNAS POR MALDI-TOF MS	47
5.2	ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DAS LPMOS	49
5.2.1	<i>Análise dos produtos das reações da TfAA10-O por MALDI-TOF MS</i>	50
5.2.1.1	<i>Otimização de método para análise por MALDI-TOF MS</i>	53
5.2.1.2	<i>Análise do produto da reação de LPMOs após otimização do método de MALDI-TOF MS</i>	56
5.2.1.3	<i>Otimização das condições reacionais enzimáticas</i>	58
5.2.2	<i>Análise dos produtos das reações da enzima TfAA10-N produzida em erlenmeyer por MALDI-TOF MS</i>	64
5.2.2.1	<i>Otimização da análise por MALDI-TOF MS</i>	67
5.2.2.2	<i>Análise do produto da reação da TfAA10-N saturada com Cu²⁺</i>	73
5.2.2.3	<i>Análise do produto da reação do extrato bruto da TfAA10-N em PASC</i>	84
5.2.3	<i>Desenvolvimento de método analítico por UHPLC-ESI-MS</i>	86

5.2.3.1 DIMS (Direct Infusion Mass Spectrometry)	87
5.2.3.2 UHPLC-ESI-MS dos padrões de oligossacarídeos e celulose.....	88
5.2.4 <i>Análise do produto da reação de LPMO, produzida em biorreator, por UHPLC-ESI-MS e MALDI-TOF MS</i>	91
5.2.4.1 Análise do produto da reação da TfAA10-N em PASC e tampão de fosfato de sódio por UHPLC-ESI-MS e MALDI-TOF MS	91
5.2.4.2 Análise do produto da reação da TfAA10-N em PASC e tampão de acetato de sódio por UHPLC-ESI-MS e MALDI-TOF MS	97
6 CONCLUSÃO	104
7 REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores m/z dos prováveis celo-oligossacarídeos encontrados após a ação das LPMOs.	49
Tabela 2: Condições da reação enzimática com a TfAA10-O, produzida em <i>Erlenmeyer</i> e purificada por His-Tag.....	50
Tabela 3: Condições da reação enzimática com a TfAA10-O, produzida em <i>Erlenmeyer</i> e purificada por His-Tag, combinando diferentes concentrações de enzima e ácido ascórbico e tampões reacionais.....	59
Tabela 4: Condições da reação enzimática com a TfAA10-O, produzida em <i>Erlenmeyer</i> e purificada por His-Tag, em Avicel.	62
Tabela 5: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em <i>Erlenmeyer</i> e purificada por His-Tag e por troca iônica (DEAE) em substrato PASC.....	65
Tabela 6: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em <i>Erlenmeyer</i> e purificada por His-Tag seguida da saturação com Cu^{2+}	73
Tabela 7: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em <i>Erlenmeyer</i> e purificada por His-Tag seguida da saturação com Cu^{2+}	77
Tabela 8: Condições da reação enzimática com o extrato bruto da TfAA10-N, produzida em <i>Erlenmeyer</i> em PASC.....	84
Tabela 9. Descrição dos íons encontrados no método analítico baseado em UHPLC-ESI-MS nos modos de ionização positivo e negativo.	90
Tabela 10: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por His-Tag, em substratoPASC.	92
Tabela 11: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por His-Tag, em substratoPASC.	97
Tabela 12: Condições da reação enzimática com o extrato bruto da TfAA10-N, produzida em biorreator, em substrato PASC.	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ligação das moléculas de glicose na celulose.	21
Figura 2: Regiões cristalinas e amorfas que formam a estrutura da celulose.....	22
Figura 3: Moléculas constituintes da hemicelulose.....	22
Figura 4: Precursores da lignina..	23
Figura 5: Atuação sinérgica das celulasas.	25
Figura 6: Atuação das enzimas principais e acessórias na hemicelulose..	26
Figura 7: Representação geral dos prováveis celo-oligossacarídeos encontrados nas reações enzimáticas com LPMOs.....	29
Figura 8. Visão atual da degradação por fungos de celulose.....	30
Figura 9: Estrutura do sítio ativo da TfAA10, no qual resíduos de carbono são mostrados em cinza, de nitrogênio em azul e de oxigênio em vermelho.)	32
Figura 10. Representação simplificada dos componentes de um espectrômetro de massas. ...	34
Figura 11: (A) MALDI(+)-MS dos produtos da reação da TfAA10 em substrato celulósico PASC (<i>Phosphoric Acid Swollen Cellulose</i>) e a (B) representação das moléculas detectadas, nos quais os eventos de oxidação estão marcados em vermelho.....	37
Figura 12: Esquema resumido das diferentes condições reacionais testadas para o estudo da atividade da enzima TfAA10.....	43
Figura 13: MALDI(+)-MS da proteína TfAA10-O produzida em <i>Erlenmeyer</i> e purificada por afinidade (His-Tag), sendo aplicada na proporção de 1:3 com a matriz de ácido sináplico.....	47
Figura 14: MALDI(+)-MS da proteína TfAA10-N produzida em <i>Erlenmeyer</i> (A) e em biorreator (B), purificadas por afinidade (His-Tag)..	48
Figura 15: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da TfAA10-O em PASC (A) e Avicel (C) e os respectivos controles negativos (B- PASC na ausência da enzima e D - Avicel na ausência da enzima) ao longo dos tempos reacionais 0, 24 e 48 h.....	52
Figura 16: MALDI(+)-MS dos oligossacarídeos (celobiose – DP2 e celohexaose – DP6) nas concentrações de 62,5 µg/mL (b), 125 µg/mL (c), 250 µg/mL (d), 500 µg/mL (e) e 1000 µg/mL (f), na ausência (A) e na presença (B) de NaCl.....	54
Figura 17: Estruturas químicas dos íons referentes ao aduto de sódio da celohexaose [DP6+Na] ⁺ e dos possíveis íons gerados no processo de ionização, [DP6aa+Na] ⁺ e [DP6+K] ⁺	55
Figura 18: MALDI(+)-MS dos produtos da reação de 1 µM de LPMO TfAA10-O em 2 mg/mL de PASC (A) e Avicel (B) ao longo dos tempos de reação (0, 24 e 48 h).....	57
Figura 19: Espectros de massas por MALDI(+)-TOF MS do substrato PASC nos diferentes tampões e em água.....	60
Figura 20: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da LPMO TfAA10-O 1 µM em Avicel (2 mg/mL), na presença de ácido ascórbico (2 mM) em tampão de acetato de amônio (A) e fosfato de sódio (B) pH 6,0..	63
Figura 21: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da TfAA10-N, purificada por troca iônica (DEAE)em substrato do tipo PASC na presença (A) e ausência de ácido ascórbico (B) e	

com os respectivos controles na ausência da enzima, com (C) e sem (D) ácido ascórbico em tampão de acetato de amônio pH = 6,0.	66
Figura 22: MALDI(+)-MS das amostras de PASC plaqueadas pelo método <i>two-layer</i> (A) e <i>dried-droplet</i> (B) em diferentes proporções de amostra-matriz:(a)1:2, (b)1:3 e (c) 1:5. .	68
Figura 23: MALDI(+)-MS das amostras de PASC plaqueadas pelo método <i>dried-droplet</i> com matriz nas concentrações de 20 mg/mL (A) e 9 mg/mL (B).	69
Figura 24: MALDI(+)-MS das amostras de PASC plaqueadas pelo método <i>dried-droplet</i> , utilizando o DHB (9 mg/mL) como matriz, com diferentes proporções amostra-matriz: 1:1 (A), 1:1,5 (B), 1:2 (C), 1:2,5 (D) e 1:3 (E)	70
Figura 25: Etapas para otimização do preparo de amostras para análise por MALDI-TOF MS. Em negrito são mostrados os melhores parâmetros e que foram considerados para a análise do próximo parâmetro até a obtenção do melhor método.	71
Figura 26: MALDI(+)-MS da amostra (PASC após 48 h de incubação a 50° C e 1400 rpm) analisada pelo método antes (A) e após (B) a otimização do método analítico.	72
Figura 27: MALDI(+)-MS dos produtos da reação entre TfAA10 purificada por troca iônica e saturada com cobre em substrato PASC (2 mg/mL) na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência de ácido ascórbico (D).	74
Figura 28: MALDI(+)-MS dos cluster do heptâmero (DP7) proveniente da reação entre TfAA10-N purificada por troca iônica e saturada com cobre em substrato PASC (2 mg/mL) na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência do doador de elétrons (D)..	76
Figura 29: MALDI(+)-MS na faixa <i>m/z</i> 720-2000 dos produtos da reação entre TfAA10 purificada por troca iônica e saturada com cobre em substrato celohexaose (DP6) 0,5 mg/mL na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência do ácido ascórbico (D)..	78
Figura 30: MALDI(+)-MS dos produtos da reação entre TfAA10 purificada por troca iônica e saturada com cobre em substrato celohexaose (DP6) 0,5 mg/mL na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência do ácido ascórbico (D).	80
Figura 31: MALDI(+)-MS dos produtos entre TfAA10 saturada com cobre em substrato celohexaose (DP6) após 48h de reação. São mostrados produtos na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência de ácido ascórbico (D)..	82
Figura 32: MALDI(+)-MS dos produtos da reação entre o extrato bruto de TfAA10 e o substrato PASC (A) na presença e (B) ausência do ácido ascórbico..	85
Figura 33: (A) ESI(+)-MS e (B) ESI(-)-MS de um padrão de oligossacarídeo (celopentaose - DP5)..	88
Figura 34: UHPLC-ESI-MS dos padrões de oligossacarídeos: ácido glucurônico (DP1aa), glicose (DP1), celobiose (DP2), celotriose (DP3) e celotetraose (DP4).	89
Figura 35: UHPLC-ESI(+)-MS) dos produtos da reação da enzima TfAA10-N produzida em biorreator e purificada por afinidade, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de fosfato de sódio pH 6,0 no tempo inicial (a) e após 72 h (b) a 50°C e 14000 rpm.	93

Figura 36: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da enzima TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de fosfato de sódio pH 6,0após 72 h a 50°C e 14000 rpm..	94
Figura 37: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da enzima TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, na presença de ácido ascórbico, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de fosfato de sódio pH 6,0 ao longo dos tempos reacionais de 0, 24 e 72 h, a 50°C e 14000 rpm.	95
Figura 38: Representação esquemática da atuação das LPMOs na celulose com liberação de oligossacarídeos oxidados e nativos.	96
Figura 39: UHPLC-ESI(+)-MS) dos produtos da reação da enzima TfAA10-N produzida em biorreator e purificada por afinidade, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de acetato de sódio pH 5,2 no tempo inicial (a) e após 72 h (b) a 50°C e 14000 rpm.	98
Figura 40: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da enzima TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de acetato de sódio pH 5,2 após 72 h a 50°C e 14000 rpm.	99
Figura 41: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da enzima TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, na presença de ácido ascórbico, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de acetato de sódio pH 5,2 ao longo dos tempos reacionais de 0, 24 e 72 h, a 50°C e 14000 rpm.	100
Figura 42: UHPLC-ESI(+)-MS) dos produtos da reação da enzima TfAA10-N, produzida em biorreator na forma de extrato bruto utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de acetato de sódio pH 5,2 na presença de enzima e de ácido ascórbico (a) após 72 h de reação.	102

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice A: Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das LPMOs.	113
Apêndice B: Condições das reações com TfAA10.	114
Apêndice C: Predição de glicosilação	116
Apêndice D: DIMS dos padrões de oligossacarídeos.....	118

1 INTRODUÇÃO

O modelo de biorrefinaria se baseia no aproveitamento total da biomassa vegetal, principalmente resíduos agroindustriais, ao longo da cadeia produtiva levando a obtenção de diversos produtos com diferentes aplicações (NIZAMI *et al.*, 2017). Os biocombustíveis, como etanol, podem ser considerados exemplos de produtos a serem gerados em modelos de biorrefinaria. A cadeia produtiva de cana-de-açúcar é um modelo de biorrefinaria, nesse modelo é possível obter etanol, açúcar, extrato de levedura e energia elétrica (co-geração com queima de bagaco). Os resíduos deste setor, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, podem gerar outros bioprodutos, como monômeros de açúcares para fermentação microbiana e geração de etanol de segunda geração (DEMIRBAS, 2009).

A utilização de biomassas vegetais para obtenção de açúcares fermentescíveis, no modelo de biorefinaria, requer processos adicionais de pré-tratamento e hidrólise enzimática (SOREK *et al.*, 2014). Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de otimizar a etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica, por meio do emprego de enzimas microbianas, como celulasas e hemicelulasas (RYTIOJA *et al.*, 2014). Porém a utilização de enzimas auxiliares pode ajudar na atuação dessas hidrolases. Dentre as enzimas auxiliares, as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) têm sido apontadas como promissoras para a degradação da celulose e de outros polissacarídeos (LEVASSEUR *et al.*, 2012; HORN *et al.*, 2012; AGGER *et al.*, 2014; BEESON *et al.*, 2015).

As LPMOs atuam por meio de clivagens oxidativas dependentes principalmente de oxigênio molecular (ou peróxido de hidrogênio) e doador de elétrons (enzimático ou não-enzimático) (EIBINGER *et al.*, 2014). E através da oxidação de polissacarídeos recalcitrantes, as LPMOs podem acelerar a degradação desses polímeros (VERMAAS *et al.*, 2015), aumentando a eficiência do processo de sacarificação (HARRIS *et al.*, 2010).

Ensaio enzimáticos na presença de substratos celulósicos sintéticos podem ser realizados a fim de verificar a atividade enzimática das LPMOs, tais como: Avicel e PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*). Além do substrato empregado nos ensaios enzimáticos de LPMOs, outros fatores reacionais como doador de elétrons, temperatura, agitação, tempo e tampão de incubação devem ser considerados (ISACKEN *et al.*, 2014; FORSBERG *et al.*, 2014).

Os oligossacarídeos, produtos obtidos durante as reações com LPMOs, podem ser analisados a partir de técnicas sensíveis, como a espectrometria de massas. A baixa concentração e pequenas mudanças estruturais dos produtos gerados são as principais

justificativas para uso de tais técnicas (WESTERENG *et al.*, 2013; FROMNHAGEN *et al.*, 2015; WESTERENG *et al.*, 2017).

A espectrometria de massas é definida como sendo uma técnica analítica, que utiliza princípios físicos para caracterizar moléculas, por meio da relação massa-carga (m/z) desses analitos. Essa técnica permite realizar uma análise quantitativa e qualitativa das amostras com alta sensibilidade, seletividade e rapidez. O tipo de espectrômetro de massas empregado em uma análise depende das características da amostra (LESK, 2008; HARRIS, 2008). Dentre os métodos analíticos mais utilizados para o estudo dos produtos das reações de LPMOs se destaca MALDI-TOF MS e LC-MS (WESTERENG *et al.*, 2013; WESTERENG *et al.*, 2017).

Porém, descobertas contínuas a respeito das LPMOs e outras enzimas com ação oxidativa em carboidratos requerem um grande repertório de métodos que possam detectar uma ampla faixa dos produtos. Além disso, as diversas condições reacionais, tais como tampões de reação ou doadores de elétrons podem interferir nos sinais obtidos pelos métodos analíticos (WESTERENG *et al.*, 2017, p.79) exigindo otimização e/ou desenvolvimento de novos métodos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), produzidas por leveduras recombinantes, utilizando substratos celulósicos por técnicas avançadas de espectrometria de massas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar o perfil das LPMOs empregadas na reação de degradação da celulose por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS);
- ✓ Otimizar as condições reacionais do processo enzimático para aumentar a eficiência das LPMOs em substratos celulósicos;
- ✓ Desenvolver e otimizar métodos analíticos baseados em espectrometria de massas (MALDI-TOF MS e UHPLC-ESI-MS) para análise dos produtos da reação entre LPMOs e celulose.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biorrefinaria de biomassas vegetais

As biorrefinarias consistem na combinação de tecnologias para integração dos processos industriais já consolidados acoplados com outros, de modo a alcançar o máximo aproveitamento da cadeia produtiva a partir da biomassa, gerando bioprodutos com alto valor agregado em diversos setores (NIZAMI *et al.*, 2017). Elas podem ser classificadas, dentre elas quanto: (i) ao tipo de plataforma utilizada (como açúcares C5/C6, lignina, óleos e biogás), (ii) tipos de produtos gerados (biocombustíveis, químicos ou materiais), (iii) matéria-prima (resíduos agroindustriais, resíduos florestais, resíduos orgânicos e biomassa aquática) e (iv) processos de conversão (bioquímico e termoquímico) (DEMIRBAS, 2009; IEA Bioenergy, 2010).

Os biocombustíveis podem ser exemplos de produtos a serem gerados em modelos de biorrefinaria por integrar diversos produtos e tecnologias na cadeia produtiva. Destaca-se que eles são ainda considerados sustentáveis por serem produzidos a partir de fontes renováveis e podem ajudar a minimizar a queima de combustíveis fósseis e a produção de dióxido de carbono (NAIK *et al.*, 2010).

Estes combustíveis sustentáveis podem ser classificados como sendo de primeira, segunda, terceira e quarta geração. Os biocombustíveis de primeira geração são aqueles derivados de materiais amiláceos, açucarados, óleo vegetal ou qualquer gordura animal processada por metodologias tradicionais, enquanto que os de segunda geração utilizam os resíduos como matéria-prima. Os de terceira geração incluem aqueles que utilizam algas como matéria-prima para a produção de biodiesel ou dos chamados “*oilgae*”; e os de quarta geração incluem todas as inovações como o desenvolvimento tecnológico para o uso de microrganismos geneticamente modificados que produzem combustíveis a partir de dióxido de carbono (AWASTHI *et al.*, 2015). Sendo que a principal diferença entre cada uma das gerações de biocombustíveis é o nível tecnológico utilizado para sua produção (LÜ, SHEAHANB e FU, 2011).

No grupo dos biocombustíveis de primeira geração (1G) têm-se diversos produtos, cuja produção já é consolidada no Brasil e no mundo. Dentre eles podem ser citados: o biodiesel sintetizado por transesterificação de óleo vegetal ou gordura animal, biogás produzido a partir da fermentação de matéria orgânica por microrganismos anaeróbicos, singás obtido através da pirólise de biomassa seguida de combustão e gaseificação, os

bioálcoois derivados da fermentação de carboidratos simples (como sacarose e xilose) ou complexo (como amido e celulose) (AWASTHI *et al.*, 2015).

Apesar de minimizarem a emissão de dióxido de carbono (CO₂), os biocombustíveis 1G podem impactar na biodiversidade devido ao uso e competição com produtos destinados à alimentação. Isso porque as matérias-primas mais usadas para a produção de biocombustíveis de primeira geração são milho, trigo, cana-de-açúcar, soja, canola e girassol, que também são utilizadas para a alimentação humana (AJANOVIC, 2011).

Pelo fato de não competirem com o setor alimentício e da sua capacidade de aproveitamento de resíduos, os biocombustíveis de segunda geração (2G) são considerados ainda mais sustentáveis (AJANOVIC, 2011). Eles podem utilizar resíduos agroindustriais e/ou florestais como matéria-prima para a produção de biocombustíveis (AWASTHI *et al.*, 2015), que se enquadram como biomassa lignocelulósica.

3.2 Biomassa lignocelulósica

Aproximadamente $1,8 \times 10^{12}$ toneladas de biomassa são produzidas no planeta Terra anualmente, considerando os ecossistemas terrestres e marinhos, sendo que 60% desta biomassa é lignocelulósica. A biomassa lignocelulósica consiste no material estrutural da parede celular vegetal (PHILIPPIDIS, 1994 *apud* SZAKACS, TENGARDY e NAGY, 2010).

Os resíduos agroindustriais são considerados como biomassa lignocelulósica, que se apresentam como fontes de carbono de baixo custo e com alto potencial para serem utilizados na conversão química ou microbiana (TAMANINI e HAULY, 2004). No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico com maior produção.

De acordo com os dados da safra de 2017/2018 disponibilizados pela Conab (2018), o Brasil produzirá cerca de 650 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Considerando que 25% da massa de cana-de-açúcar correspondente ao bagaço (RAMOS e NACHILUK, 2017) e e os dados da safra de 2017/2018, então são estimados 163 milhões de toneladas de bagaço. A fim de aproveitar estes resíduos gerados pelo crescente desenvolvimento da agricultura e da indústria, tais materiais são visados como potenciais fontes de energia.

Neste cenário o Brasil apresenta grande potencial para ser uma liderança mundial no aproveitamento de biomassa lignocelulósica, sobretudo devido à alta produção e necessidade de reaproveitamento. Diversas empresas sucroalcooleiras brasileiras já utilizam o bagaço de cana-de-açúcar para cogeração de energia (térmica, mecânica e elétrica) a partir da queima desta biomassa. Além disso, as empresas Raízen (Piracicaba-SP) e GranBio (São Miguel dos

Campos-AL) possuem plantas industriais para produção de etanol 2G a partir de coprodutos da cana-de-açúcar (bagaço e palha) gerados nos processos tradicionais de obtenção de etanol 1G e de açúcar.

Estruturalmente a biomassa lignocelulósica é composta basicamente por três unidades estruturais principais: celulose, hemicelulose e lignina (NAIK *et al.*, 2010; SZAKACS, TENGEDY e NAGY, 2010). Sendo que a porcentagem de cada um destes constituintes pode variar de acordo com o tipo da biomassa (TAMANINI e HAULY, 2004; PAULY e KEEGSTRA, 2008).

Os materiais lignocelulósicos possuem dois tipos de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) que estão ligados pelo terceiro componente (lignina). A celulose é um homopolímero de hexose, na qual as unidades de D-glicose estão unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 1) (LIMAYEM e RICKE, 2012; RYTIOJA *et al.*, 2014).



Figura 1: Ligação das moléculas de glicose na celulose Fonte: Adaptado de Taiz e Zieger (2002) e Farinas (2010).

Esses polímeros de glicose são unidos por ligações de hidrogênio, resultando na formação de fibrilas, que são responsáveis pelo elevado grau de cristalinidade dessa molécula. Há também regiões amorfas que possuem menor quantidade de pontes de hidrogênio, permitindo maior flexibilidade da parede vegetal – Figura 2 (FARINAS, 2011; LIMAYEM e RICKE, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; RYTIOJA *et al.*, 2014).

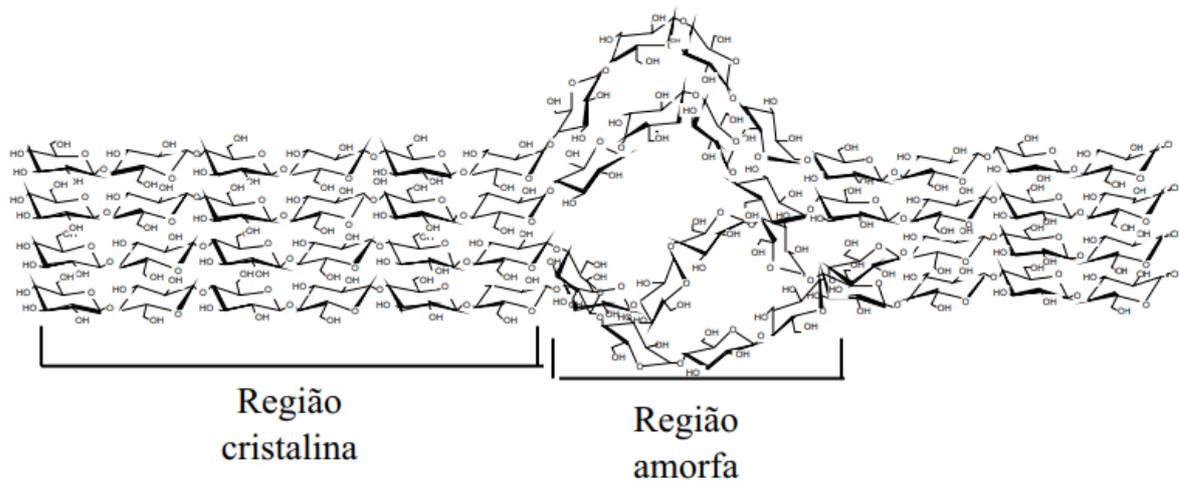


Figura 2: Regiões cristalinas e amorfas que formam a estrutura da celulose. Fonte: Farinas (2011).

A hemicelulose, outro componente da parede celular vegetal, é um heteropolímero constituído de cadeias lineares contendo ramificações laterais formadas por hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e pode conter ácidos urônicos (ou hexurônicos), tal como ácido D-glucurônico, D-galacturônico e metilglucurônico (Figura 3). Destaca-se ainda que a hemicelulose é responsável pela estabilidade e flexibilidade do agregado lignocelulósico, visto que suas ramificações interagem facilmente com a celulose (LIMAYEM e RICKE, 2012; RYTIOJA *et al.*, 2014).

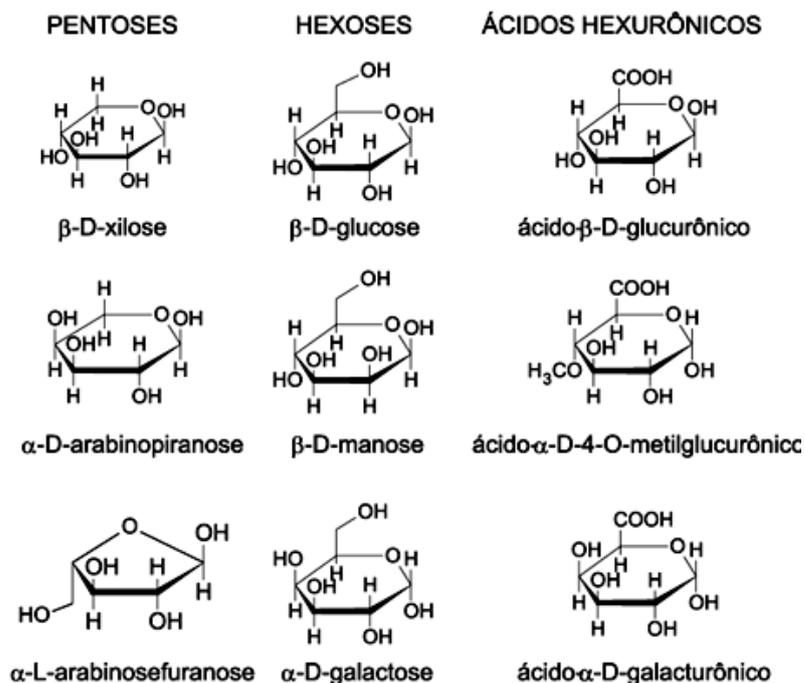


Figura 3: Moléculas constituintes da hemicelulose. Fonte: Morais *et al.*, (2005).

O terceiro componente da estrutura da parede celular vegetal é a lignina, uma macromolécula fenólica, formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 4). Essa macromolécula preenche os espaços entre as fibras de celulose, juntamente com a hemicelulose e pectina (LIMAYEM e RICKE, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; RYTIOJA *et al.*, 2014).



Figura 4: Precursores da lignina. Fonte: Adaptado de Farinas (2011).

Diversos produtos podem ser obtidos a partir da biomassa lignocelulósica, dentre os quais podem ser citados produtos de valor agregado como sorbitol, aminoácidos, ácido levulínico, ácido succínico e ácido lático, além dos biocombustíveis, como etanol e metano (IEA Bioenergy, 2010, p. 24). Porém, para a utilização desta biomassa na produção destes compostos é necessário primeiramente promover a desconstrução dessa estrutura lignocelulósica. Um dos grandes desafios do modelo de biorrefinaria que propõe aproveitar ao máximo as biomassas disponíveis é realizar a desconstrução da parede celular vegetal de forma a separar os componentes por tipo e aplicações biotecnológicas (BHOWMICK, SARMAH e SEN, 2018).

3.3 Desconstrução da parede celular vegetal

Diversas tecnologias têm sido estudadas para melhorar a eficiência da desconstrução da parede celular vegetal (SOREK *et al.*, 2014). Esse processo envolve duas etapas principais: pré-tratamento e hidrólise. Diversos processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica podem ser empregados. Eles podem ser divididos em: físico (como moinho de bolas), químico (por exemplo, ácido, alcalino, ozonólise e organosolv), biológico e combinado (como explosão a vapor e AFEX). O método escolhido deve apresentar diversas características, tais

como: alta recuperação dos açúcares, alta digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática posterior, alta concentração de sólidos, elevada concentração de açúcares na fração líquida e baixa demanda energética, investimento e custo operacional baixos (SANTOS *et al.*, 2012; BHOWMICK, SARMAH e SEN, 2018).

Destaca-se que o pré-tratamento promove a ruptura do complexo lignocelulósico, separando a celulose, hemicelulose e lignina, sendo que os dois primeiros deverão ser hidrolisados em monômeros para serem metabolizados por microrganismos e convertidos no produto de interesse. Dessa forma, após o pré-tratamento é necessário fazer uso de enzimas específicas, que serão responsáveis pela hidrólise do polímero de celulose e/ou hemicelulose (HENDRICKS e ZEEMAN, 2009; SUN e CHENG, 2002).

Os gargalos para obtenção do etanol de segunda geração (2G) estão em todas as etapas do processo desde a desconstrução da parede celular vegetal até a conversão do produto final, como os biocombustíveis 2G. A escolha de um processo influenciará em todas as etapas seguintes do processo de etanol 2G. Deste modo, diversos estudos são realizados a fim de minimizar os gargalos e chegar a um produto econômico-social-ambiental factível (SOREK *et al.*, 2014). Dentre essas etapas, a descoberta de novas enzimas e/ou coquetéis enzimáticos que aumentem a eficiência da etapa de hidrólise é um dos focos do setor de bioenergia e biotecnologia.

3.4 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática das frações celulósica e hemicelulósica da biomassa vegetal é realizada por celulasas e hemicelulasas, respectivamente. As celulasas são compostas por três enzimas principais que agem de forma sinérgica, onde as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) clivam especificamente as ligações β -1,4-glicosídica internas da celulose, principalmente em regiões amorfas, liberando fragmentos que serão degradados pelas exoglucanases (E.C. 3.2.1.91) – também denominadas celobiohidrolases (CBH) – à celobiose, que por sua vez será degradada pelas β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) à glicose – Figura 5 (OGEDA e PETRI, 2010; SZAKACS, TENGARDY e NAGY, 2010).

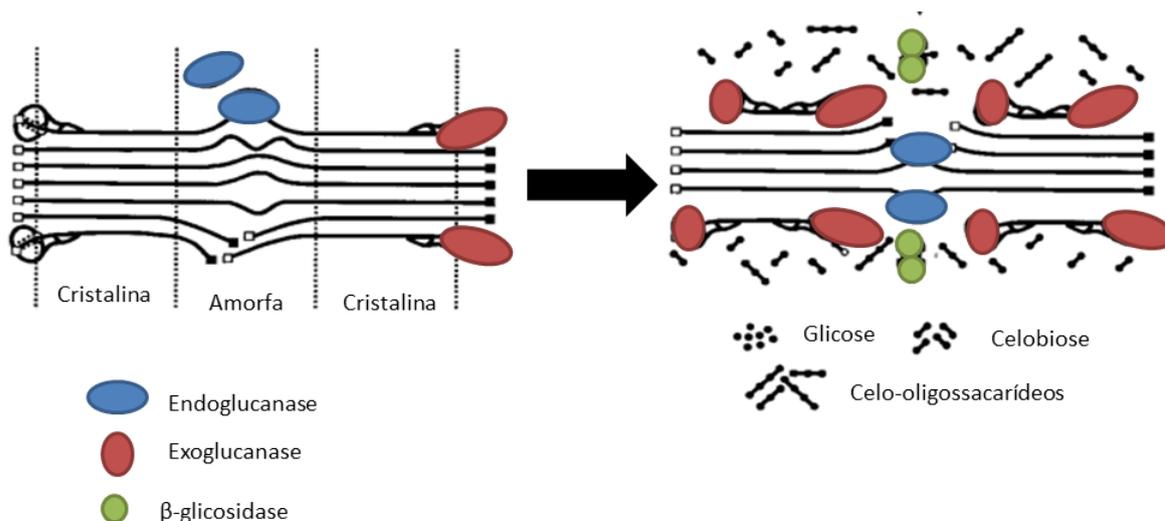


Figura 5: Atuação sinérgica das celulases. Adaptado de Lynd *et al.* (2002).

Ressalta-se que as β -glicosidases são capazes de clivar outros oligossacarídeos à glicose e também de liberar outros monômeros, como xilose, galactose e manose, a partir da xilana e da galactomanana (RYTIOJA *et al.*, 2014), que são constituintes da hemicelulose.

As celulases podem ser produzidas por fungos ou por bactérias, tanto aeróbicas ou anaeróbicas, mesofílicas ou termofílicas (SUN e CHENG, 2002; SZAKACS, TENGERDY e NAGY, 2010). E também podem ser produzidas de forma heteróloga, utilizando como hospedeiros a bactéria *Escherichia coli* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Komagataella phaffii* (CASTRO e PEREIRA, 2010). Quanto ao sistema fermentativo essas enzimas podem ser produzidas por fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES) dependendo da aplicação pretendida. Caso não seja necessário um alto grau de pureza, como, por exemplo, em aplicações agrobiotecnológicas, a fermentação em estado sólido é preferível, pois reduz os gastos operacionais, visto que a purificação é uma das principais etapas que oneram o processo produtivo (SZAKACS, TENGERDY e NAGY, 2010).

Devido à variedade das moléculas que constituem a hemicelulose, um arsenal enzimático é exigido para a completa hidrólise desse heteropolímero em monômeros de xilose e outros compostos (Figura 6). Nesse complexo enzimático, a xilanase e 1,4- β -xilosidase se caracterizam como sendo as enzimas principais, e as demais como acessórias (DODD e CANN, 2009).

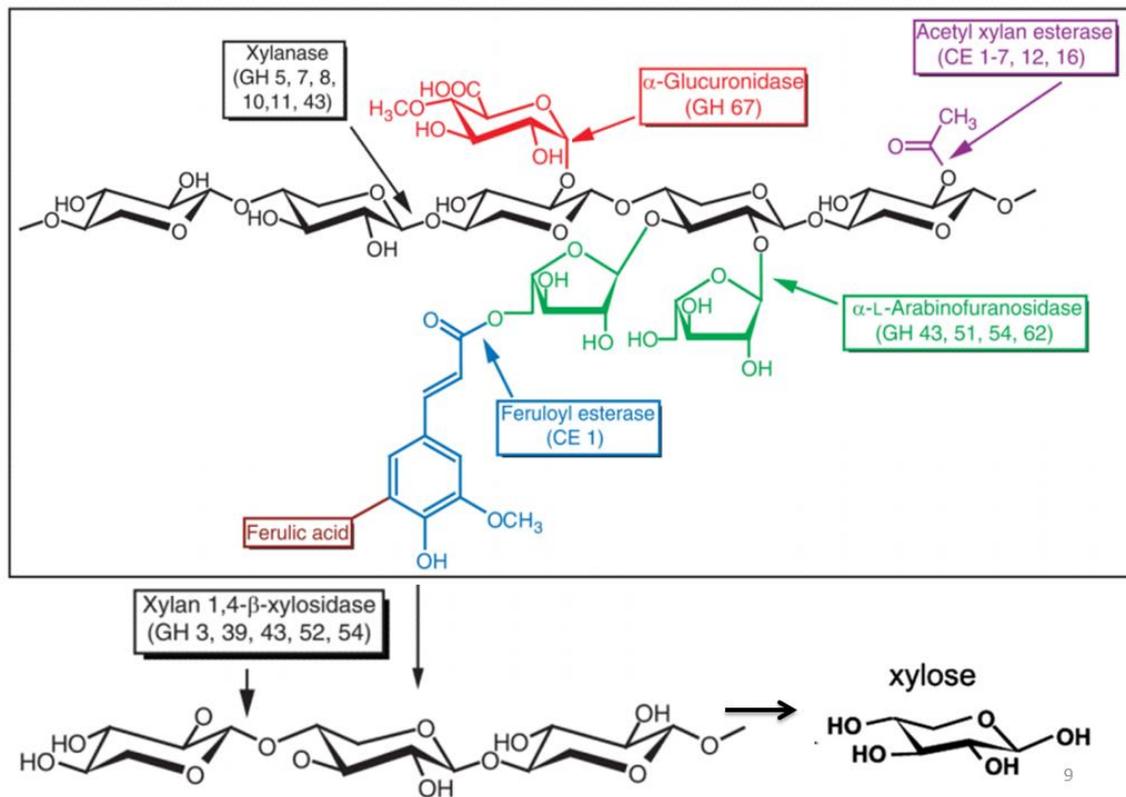


Figura 6: Atuação das enzimas principais e acessórias na hemicelulose. Fonte: Adaptado de Dodd e Cann (2009) e Sun *et al.* (2012).

Dentre as hemicelulases podem ser citadas as enzimas endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) e 1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37), que são enzimas principais e tem sua ação complementada por enzimas acessórias como α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), β -feruloil esterase (EC 3.1.1.73), β -glicuronidase (EC 3.2.1.139) e acetilxilano esterase (EC 3.1.1.72) (GILBERT, 2010). É importante destacar que as enzimas xilanolíticas podem ser obtidas por uma grande variedade de microrganismos. Dentre eles podem ser citados os fungos filamentosos, as leveduras e bactérias (PREMA, 2010).

3.5 Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs)

3.5.1 Descoberta e características gerais

Em meados de 1950, Reese e colaboradores sugeriram que a hidrólise da celulose requeria um componente não-hidrolítico para facilitar o acesso das enzimas hidrolíticas (REESE, SIU e LEVINSON, 1950). No início da década de 90, a análise do genoma de alguns fungos permitiu identificar algumas enzimas com potencial para degradação da

celulose. Essas enzimas foram inicialmente anotadas como sendo da família 61 das glicosil hidrolases (GH61) (BEESON *et al.*, 2010).

Em 2005, Vaaje-Kosltad e outros pesquisadores descobriram uma bactéria capaz de hidrolisar a quitina através da produção de uma enzima (CBP21), que por sua vez aumentava a eficiência da quitinase e possivelmente das celulases. E essa proteína foi então anotada como pertencente à família 33 de Módulo de Ligação ao Carboidrato (do inglês *Carbohydrate-Binding Module*) – CBM33, pela similaridade estrutural e funcional (VAAJE-KOSLTAD *et al.*, 2005).

Em 2010, informações adicionais a respeito dessas enzimas permitiram uma melhor compreensão, que levaram consequentemente a sua reclassificação. Harris e colaboradores (2010) mostraram que algumas enzimas classificadas como GH61 não possuíam atividade hidrolítica quando empregadas individualmente. Porém essas enzimas eram capazes de atuar em sinergismo com celulases na degradação da biomassa lignocelulósica, na presença de íons metálicos por mecanismos desconhecidos.

Vaaje-Kolstad e colaboradores (2010) mostraram que a enzima CBP21 é capaz de realizar clivagem oxidativa de quitina na presença de oxigênio molecular e de um agente redutor (ácido ascórbico). Esses pesquisadores propuseram um mecanismo de ação semelhante para as GH61 atuarem nas celuloses.

Tendo em vista o mecanismo de ação dessas enzimas, que podem degradar oxidativamente polissacarídeos na presença de oxigênio molecular e de um agente redutor, estas foram nomeadas como mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, do inglês *Lytic Polysaccharides Monooxygenases*) (HORN *et al.*, 2012). Essas enzimas têm sido apontadas como promissoras na degradação de diversos polissacarídeos, como celulose (ISAKSEN *et al.*, 2014; FORSBERG *et al.*, 2014; BENNATI-GRANIER *et al.*, 2015), hemicelulose (AGGER *et al.*, 2014), amido (LO LEGGIO *et al.*, 2015) e quitina (VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2010; LO LEGGIO *et al.*, 2015).

Atualmente, as LPMOs são classificadas em diferentes famílias com base na origem microbiana e do substrato ao qual realiza a ação oxidativa (CAZy - *Carbohydrate Active Enzymes database*; LOMBARD *et al.*, 2014). A família AA9 (*Auxiliary Activity 9*) inclui LPMOs exclusivamente de fungos com ação oxidativa sobre a celulose. A família AA10 inclui LPMOs principalmente de origem bacteriana, as quais podem clivar celulose ou quitina. Já a família AA11 inclui LPMOs de origem fúngica com ação sobre quitina, enquanto que a família AA13 inclui LPMOs de fungos capazes de clivar amido de forma oxidativa (LO LEGGIO *et al.*, 2015).

3.5.2 Mecanismo de ação

Atualmente é proposto um modo geral para ação das LPMOs. Porém, ainda não se sabe detalhadamente todos os mecanismos de ação destas enzimas, tendo em vista a variedade das LPMOs e a natureza e complexidade dos substratos em que elas podem atuar, (ISAKEN *et al.*, 2014; BEESON *et al.*, 2015).

O mecanismo de ação das LPMOs descrito atualmente relata que tais enzimas atuam por meio de clivagens oxidativas dependentes de doador de elétrons (enzimático ou não enzimático) (FROMMHAGEN *et al.*, 2016), de oxigênio molecular e/ou peróxido de hidrogênio (BISSARO *et al.*, 2017) e de íons Cu^{2+} (MARINAI, 2013; LOOSE *et al.*, 2014; LOOSE *et al.*, 2016; FRANDBSEN e SIMONS., 2016; VALENZUELA *et al.*, 2017) ou outros íons metálicos (HARIS *et al.*, 2010; VAAJE-KOLSTAD *et al.*, 2010) ligados ao sítio ativo da enzima, que por sua vez é coordenado por resíduos de histidina (BEESON *et al.*, 2015).

O mecanismo de ação proposto ocorre com a atuação do sítio ativo (provavelmente os íons metálicos) na redução do oxigênio molecular (ou peróxido de hidrogênio), sendo necessário um doador de elétrons externo. Essa redução provavelmente abstrai um hidrogênio do substrato, acarretando na clivagem da ligação β -1,4-glicosídica, e conseqüentemente, na oxidação de um carbono dessa ligação. A oxidação pode ocorrer na posição C1 e/ou C4 da ligação glicosídica, que formam intermediários hemiacetais instáveis resultando em aldonolactonas (oxidação em C1) ou cetoaldoses (oxidação em C4).

As aldolactonas são moléculas instáveis, que na presença de água, são facilmente convertidas para produtos estáveis na forma de ácidos aldônicos. As cetoaldoses podem estar em equilíbrio com a forma gemdiol, na presença de água. Em geral, as formas estáveis de uma oxidação em C1 é o ácido aldônico (produz terminal redutor) e para uma oxidação em C4 é a forma de cetoaldose (terminal não-redutor), sendo estes os produtos esperados para a ação das LPMOs. Além dessas formas, podem ainda ser encontradas as formas duplamente oxidadas (em C1 e C4). Todas essas estruturas estão representadas na Figura 7 (FORSBERG *et al.*, 2014; BEESON *et al.*, 2015).

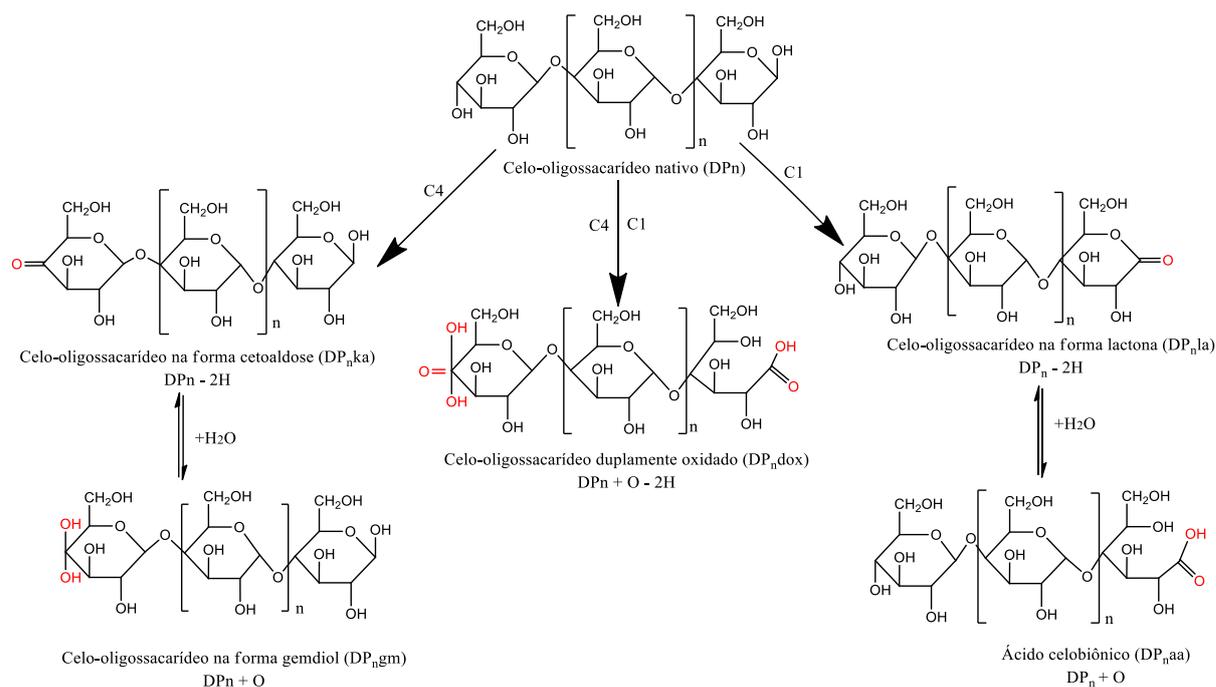


Figura 7: Representação geral dos prováveis celooligossacarídeos encontrados nas reações enzimáticas com LPMOs. Adaptado de Forsberg *et al.* (2014) e Beeson *et al.* (2015).

Os produtos gerados pelas LPMOs permitem que elas sejam classificadas em tipo 1, 2 ou 3. LPMOs do tipo 1 são aquelas que produzem produtos oxidados em C1 e as do tipo 2 se referem àquelas que produzem produtos oxidados em C4. Enquanto as LPMOs do tipo 3 se referem àquelas enzimas que produzem produtos oxidados em C1 e C4 (BEESON *et al.*, 2015). Destaca-se que a oxidação em C6 foi mencionada por alguns pesquisadores com base na análise dos produtos por espectrometria de massas (QUILAN *et al.*, 2011; BEY *et al.*, 2012). Porém, com base na reatividade das LPMOs sugere que a oxidação em C6 não ocorre (VU *et al.*, 2014).

A ação oxidativa das LPMOs podem auxiliar na degradação dos polissacarídeos em combinação com as quitinasas, celulases e hemicelulases (AGGER *et al.*, 2014; RYTIOJA *et al.*, 2014). Estudos mostram ainda que a oxidação de polissacarídeos recalcitrantes por LPMOs permite a descristalização da celulose, facilitando o acesso a outras enzimas (VERMAAS *et al.*, 2015).

A utilização das LPMOs, juntamente com as holocelulases (hemicelulases e celulases), permite a redução da carga enzimática necessária para a hidrólise da biomassa lignocelulósica (HARRIS *et al.*, 2010). Dessa forma, essas enzimas se tornam alvo para a utilização em coquetéis enzimáticos garantindo menor custo e maior eficiência na conversão da biomassa em produtos de interesse direcionados a aplicações na biorrefinaria.

É importante destacar que devido a descoberta de novas proteínas auxiliares para degradação da cadeia polissacarídica celulósica, um novo modelo de arsenal enzimático foi proposto (Figura 8). Nesse modelo as enzimas principais (endoglucanases, exoglucanases/celobiohidrolases e β -glicosidase) atuam sinergicamente entre si e com as LPMOs (HORN *et al.*, 2012).

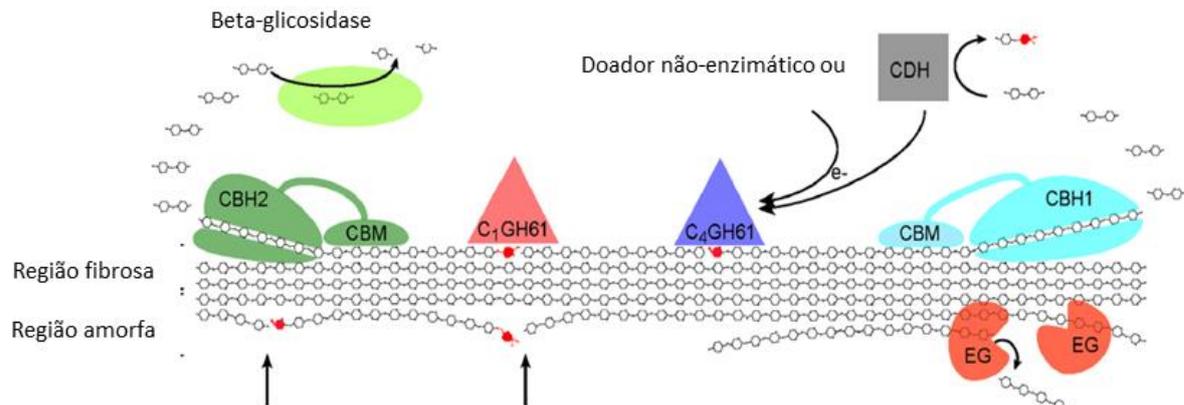


Figura 8. **Visão atual da degradação por fungos de celulose.** As enzimas do sistema celulolítico endoglucanase (EG) e celobiohidrolase (CBH), ligadas a CBM (Módulo de ligação ao carboidrato) possuem diversas formas de ação em várias partes do substrato, em função da cristalinidade e acessibilidade deste. Os carbonos C1 e C4 são oxidados por LPMOs (C₁GH61 e C₄GH61), que no geral liberam terminais (não-oxidados) para a atuação das CBHI e CBHII (açúcares oxidados estão em vermelho). A combinação das enzimas oxidativas de C1 e C4 produz celoligossacarídeos na cadeia interna da celulose, o que facilita o acesso da CBH. Destaca-se que as LPMOs necessitam de elétrons proveniente da CDH (celobiose desidrogenase) ou outro doador não-enzimático (como ácido ascórbico) para catalisar a reação. Fonte: Horn *et al.*, 2012).

3.5.3 LPMO de *Thermobifida fusca*

A *Thermobifida fusca* é uma bactéria (Filo Actinobacteria) encontrada nos solos, em materiais orgânicos com temperatura de 50-55 °C, tal como as pilhas de compostagem. Isso porque ela é uma bactéria termofílica, sendo que cresce bem a 50 °C utilizando a celulose como única fonte de carbono, através do arsenal enzimático, composto por celulases, xilanases e enzimas acessórias que são capazes de degradar diversos polímeros. Dentre as enzimas acessórias com grande potencial para hidrolisar polissacarídeos, pode ser citada a LPMO de *Thermobifida fusca* (MOSER *et al.*, 2008).

A LPMO de *Thermobifida fusca* (estirpe XY) é considerada uma LPMO bacteriana modelo por possuir diversas informações a respeito de formas de obtenção e atividade desta. Essa enzima é denominada nas publicações com diversos nomes: Tfu_1268, TflPMO10A, E7 (FORSBERG *et al.*, 2014; e mais recentemente como TfAA10A (KRUEER-ZERHUSEN *et al.*, 2017), que será o nome adotado neste trabalho. Diversas informações a respeito da

TfAA10 podem ser obtidas a partir dos seguintes códigos de acesso: AAZ55306.1 (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*), Q47QG3 (UniProtKD – *UniProt Knowledgebase*) e 4GBO (PDB – *Protein Data Bank*).

Esta LPMO bacteriana e as demais LPMOs são produzidas de forma recombinante, tendo em vista que esses microrganismos são capazes de produzir diversas enzimas e desta forma é possível favorecer a expressão da proteína de interesse, em relação a outras enzimas com maior nível de expressão como celulases e/ou xilanases.

Para a obtenção da TfAA10A diversas construções gênicas podem ser realizadas, incluindo diferentes enzimas de restrição e vetores de clonagem e expressão. Porém, o hospedeiro em todas os casos são microrganismos procaritos, especificadamente *E. coli* (MOSER *et al.*, 2008; FORSBERG *et al.*, 2014; KOSTYLEV e WILSON, 2013; KRUER-ZERHUSEN *et al.*, 2017). Apesar desta enzima ser considerada modelo, outros modos de expressão podem propostos para a fim aumentar a atividade enzimática ou ainda o nível de expressão desta. A expressão em celulosomas, por exemplo, permitiu melhorar a degradação da celulose (ARFI *et al.*, 2014).

A TfAA10A, quando expressa em *E. coli*, apresentou atividade em diversos substratos: quitina (MOSER *et al.*, 2008; FORSBERG *et al.*, 2014), BMCC (*Bacterial MicroCrystalline Celulose*) (MOSER *et al.*, 2008), PASC (*Phosphoric Acid swollen cellulose*) (FORSBERG *et al.*, 2014), BC (*Bacterial Cellulose*) (KOSTYLEV e WILSON, 2013; KRUER-ZERHUSEN *et al.*, 2017). E também permitiram aumentar a hidrólise de quitina e celulose (papel filtro) quando empregadas em conjunto com quitinases (*Chitinase C* de *Serratia Marcescens*) e celulases (*Cel5A*, celulase de *Thermobifida fusca*), respectivamente (MOSER *et al.*, 2008). Por isso, a TfAA10A é classificada como AA10 (*Auxiliary Activity Family 10*) que clivam oxidativamente quitina e celulose em C1 e/ou C4 – tipo 3 (CAZy - *Carbohydrate Active Enzymes database*).

O sítio ativo da TfAA10 envolve resíduos do aminoácido de duas histidinas (posição 1 e 144) e de uma tirosina (posição 213). Esses resíduos conservados foram o chamado “braço de histidina” que por sua vez se ligam ao íon de cobre e à molécula de água para que a enzima desenvolva a atividade catalítica (Figura 9) (KRUER-ZERHUSEN *et al.*, 2017). Essa coordenação do sítio ativo enzimático, bem como condições reacionais como doadores de elétrons (mais utilizado ácido ascórbico), temperatura e pH (tampão adequado) são cruciais para que a LPMO apresente a atividade desejada (clivagem oxidativa).

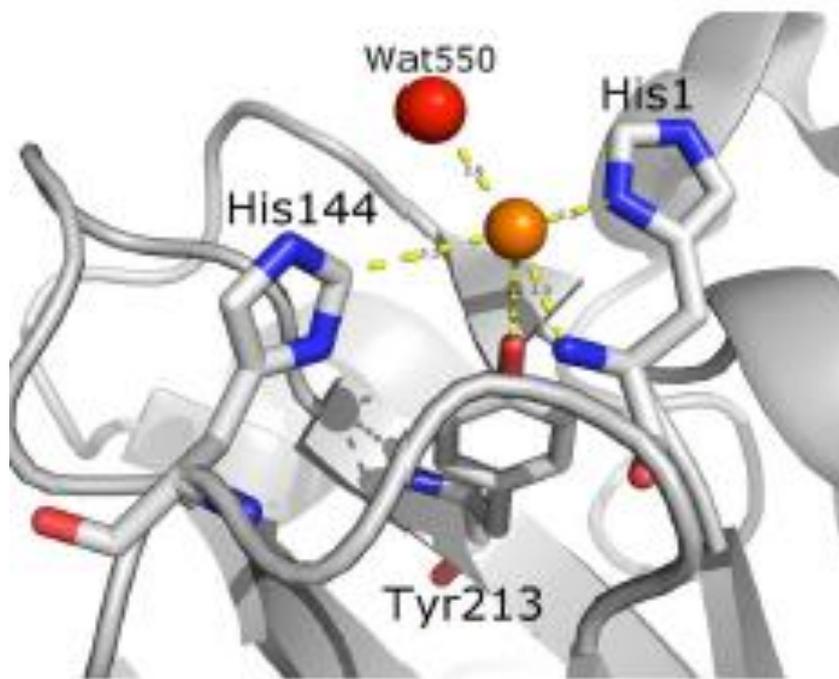


Figura 9: Estrutura do sítio ativo da TfAA10, no qual resíduos de carbono são mostrados em cinza, de nitrogênio em azul e de oxigênio em vermelho. Também são mostrados em forma de esferas a molécula de água (vermelho) e o átomo de cobre (laranja). Fonte: Figura 2b de Krueger-Zerhusen *et al.*, (2017).

3.5.4 Caracterização da atividade de LPMOs

Os produtos gerados pelas LPMOs são compostos oxidados (em C1 e/ou C4) gerados por baixa ação catalítica, exigindo o emprego de métodos analíticos sensíveis para detecção desses produtos e assim limita as possibilidades analíticas. Dessa forma, os métodos geralmente se baseiam em cromatografia e/ou espectrometria de massas. Porém, os produtos oxidados geram pequenas mudanças estruturais nos substratos, tornando desafiadora a separação cromatográfica e a identificação do produto por espectrometria de massas (WESTERENG *et al.*, 2017).

Os métodos analíticos atualmente empregados para a detecção dos produtos das LPMOs são: HPAEC-PDA (*High-Performance Anion-Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection*), MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and Time of Flight Mass Spectrometry*) e LC-MS (HILIC-MS, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* ou PGC-MS, do inglês *Porous graphitized carbon-Mass Spectrometry*).

A cromatografia HPAEC-PAD (*High-Performance Anion-Exchange Chromatography- Pulsed Amperometric Detection*) possui boa resolução e sensibilidade, no entanto, baixa seletividade. A análise de celo-oligossacarídeos nativos e/ou oxidados por HPAEC exigem maior tempo de análise (~ 50 min) e alta força de eluição, necessitando de altas concentrações salinas que por sua vez os tornam incompatíveis com a espectrometria de massas (WESTERENG *et al.*, 2013).

Por sua vez, a espectrometria de massas tem se mostrado bastante útil na análise da caracterização da atividade das LPMOs, devido a alta seletividade, sensibilidade e rapidez nas análises. Além disso, não é necessária a utilização de padrões analíticos de compostos específicos, sendo possível identificar uma ampla gama de compostos produzidos, desde compostos pequenos a macromoléculas.

3.6 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é definida como sendo uma técnica analítica que utiliza princípios físicos para caracterizar moléculas, isoladas ou em mistura, por meio de medições das suas massas e seus íons conforme a movimentação destes num campo elétrico ou magnético. Essa movimentação pode ser visualizada através dos espectros de massas, que são as respostas do detector contra a razão entre a massa e as cargas elétricas líquidas (positiva ou negativa) de uma amostra, nomeada como m/z .

É importante ressaltar que os espectros de massas são representados em duas dimensões, na qual no eixo das ordenadas indica a intensidade do sinal e no eixo da abscissa se encontra a razão m/z . E essa técnica permite realizar análises quantitativas e qualitativas de amostras com alta sensibilidade, seletividade e rapidez (VAN BRAMER, 1998 LESK, 2008; HARRIS, 2008).

Um espectrômetro de massas consiste basicamente por três componentes: fonte de ionização, analisador de massas e detector (SKOOG *et al.*, 2010), sendo que esses componentes são antecidos pela introdução da amostra e sucedido por um sistema de dados (Figura 10).

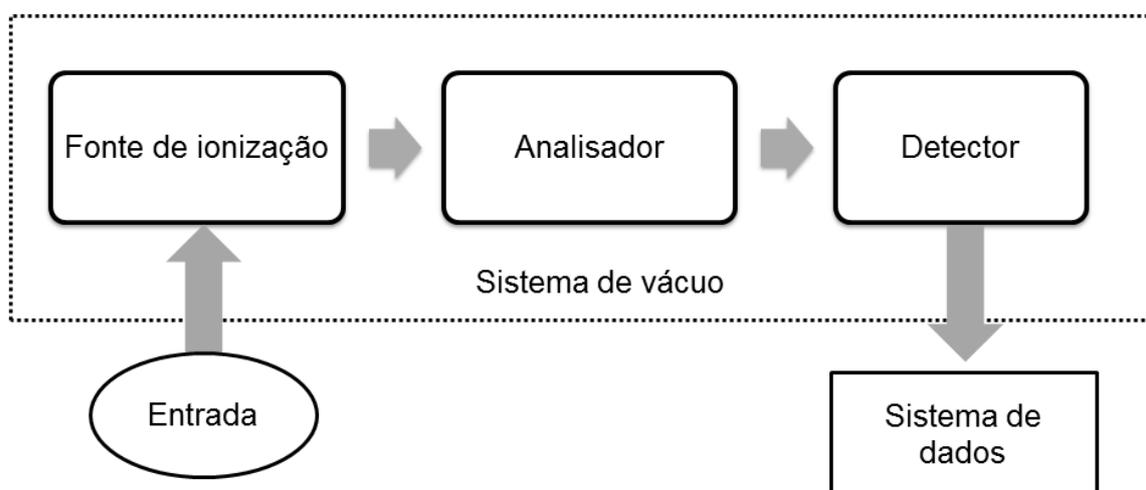


Figura 10. **Representação simplificada dos componentes de um espectrômetro de massas.** As amostras são introduzidas na fonte de ionização através de um sistema de entrada. Na fonte de ionização as amostras são fragmentadas e convertidas em íons, que são analisados nos analisadores de massas, sendo separados conforme a razão m/z , sendo esses íons captados nos detectores que geram um sinal elétrico, que tem como resposta os espectros, que por sua vez são registrados e representados por um sistema de dados (SKOOG *et al.*, 2010).

Para a introdução das amostras no espectrômetro de massas, diversas técnicas podem ser empregadas, sendo que as características físico-químicas da amostra são essenciais para a escolha do método empregado. As amostras líquidas, por exemplo, devem ser inseridas diretamente por um fluxo controlado ou por meio de espécies desorvidas a partir de fases condensadas. A cromatografia líquida pode ser utilizada no sistema de entrada de amostras, ou ainda pode ser realizada a introdução direta da amostra, pelo método denominado DIMS – *Direct Infusion Mass Spectrometry* (SKOOG *et al.*, 2010).

A ionização pode ser definida como um processo físico-químico da conversão de um átomo ou molécula em íons, adicionando ou removendo partículas carregadas com elétron ou outros íons. A ionização de uma ou mais moléculas em um espectrômetro de massas podem ser realizadas por diferentes métodos, dentre os quais se destacam: Ionização por *eletrospray* (ESI, do inglês *Electrospray ionization*) e Desorção/Ionização a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) (SKOOG *et al.*, 2010).

A ionização por eletrospray (ESI) utiliza como método de ionização um campo elétrico que produz aerosol carregado que se desolvata produzindo íons com cargas múltiplas moleculares (SKOOG *et al.*, 2010). Há dois mecanismos que explicam essa forma de ionização: fissão coulômbica ou evaporação do íon. Pela fissão coulômbica a evaporação do solvente provoca alta repulsão eletrostática entre as espécies carregadas, acarretando em sucessivas explosões coulômbicas de modo a formar gotículas contendo apenas um íon, tendo

o solvente deste íon evaporado e então transferido para a fase gasosa. O segundo modelo propõe que a evaporação do solvente acarrete em alta repulsão eletrostática que devido a tensão superficial da gota não é capaz de sustentar as cargas induzindo a transferência dos íons para a fase gasosa (CANTÚ, 2008; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

A ionização por MALDI é normalmente utilizada para análise de macromoléculas. A amostra sofre um processo de cristalização com a matriz, que geralmente é um ácido que absorve fortemente energia na região do UV de modo a co-cristalizar com a amostra. A amostra-matriz é bombardeada com pulsos de laser, que tem a energia absorvida pela matriz e transferida para a amostra desencadeando o processo de dessorção, permitindo a sublimação da amostra (estado sólido para gasoso). Destaca-se que após inúmeras colisões íon-molécula que ocorrem durante esse processo, há formação basicamente de moléculas monocarregadas que serão posteriormente analisadas (CANTÚ, 2008; LESK, 2008; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Após a ionização das amostras tais analitos são direcionados para o analisador de massas que separa os íons de acordo com os valores de m/z . Dentre os tipos de analisadores de massa, pode ser citado o quadrupolo e tempo de voo (TOF, do inglês *Time-of-flight*) (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). O analisador tipo quadrupolo consiste em quatro barras paralelas, arranjadas em dois pares opostos com diferentes potenciais elétricos entre eles, de modo que a aplicação dessas voltagens afete a trajetória centralizada dos íons. Isso permite selecionar os íons que irão atravessar o analisador e quais serão desviados (SKOOG *et al.*, 2010). A desvantagem deste analisador é a baixa resolução.

Por sua vez, o analisador tipo TOF é um analisador, no qual a velocidade e o tempo de chegada dos íons ao detector dependem da relação massa/carga da molécula, visto que íons com energia cinética iguais entram em um tubo onde se movem livremente (GROSS, 2004; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

O acoplamento dos analisadores tipo Q-TOF permite a identificação e elucidação estrutural dos compostos de baixa e média massa molecular por experimentos de HRMS (*High resolution mass spectrometry*) e MS/MS, sendo utilizado nas análises por ESI. Enquanto que o acoplamento dos analisadores tipo TOF/TOF é empregado na elucidação estrutural de macromoléculas, sendo utilizado nas análises por MALDI (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

A colisão dos íons com a superfície dos detectores causa a emissão de elétrons, fótons ou outros íons que podem ser medidos por detectores de carga ou radiação. Estes sinais são transformados e registrados ou acumulados em um sistema de dados expressos como uma

relação m/z em função da intensidade de cada composto (SKOOG *et al.*, 2010; HOFFMANN e STROOBANT, 2007). A partir destes sinais, os espectros de massas são gerados, para então serem processados e interpretados.

3.6.1 *Espectrometria de massas aplicada à caracterização da atividade de LPMOs*

Dentre as técnicas analíticas mais utilizadas para a caracterização da atividade de LPMOs estão MALDI-TOF MS e LC-MS. O MALDI-TOF MS é empregado nessas análises, tendo em vista que os ácidos aldônicos (oxidação em C1) tendem a formar sais de seus adutos. Dessa forma é possível detectar adutos duplos para esse composto com valores m/z referentes à $[M+Na]^+$ e $[M-H+2Na]^+$ para o ácido aldônico sodiado e o respectivo sal do aduto formado (DP7aa na Figura 11). Uma vez que o equilíbrio de ácido aldônico para lactona é favorecido em direção ao ácido aldônico, as análises por MALDI-TOF MS apresentam baixa intensidade para as formas lactonas ($m/z - 2$ em relação aos oligossacarídeos nativos, DP7la na Figura 11) (VAAJE-KOSLTAD *et al.*, 2010; BEY *et al.*, 2013; FORSBERG *et al.*, 2014; WESTERENG *et al.*, 2017).

Já os produtos oxidados em C4, que apresentam um equilíbrio entre as formas cetoaldose ($m/z - 2$, DP7ka – Figura 11) e gemdiol ($m/z + 16$, DP7gm na Figura 11), sendo que a primeira forma é mais expressiva. Isso porque a técnica promove desidratação ao plaquear as amostras para este tipo de análise. Os produtos duplamente oxidados em C1e C4 (DP7dox, Figura 11) também podem ser detectados através desta técnica como sais de seus adutos, nas formas $[M+Na]^+$ e $[M+2Na+H]^+$ (VAAJE-KOSLTAD *et al.*, 2010; BEY *et al.*, 2013; FORSBERG *et al.*, 2014; WESTERENG *et al.*, 2017).

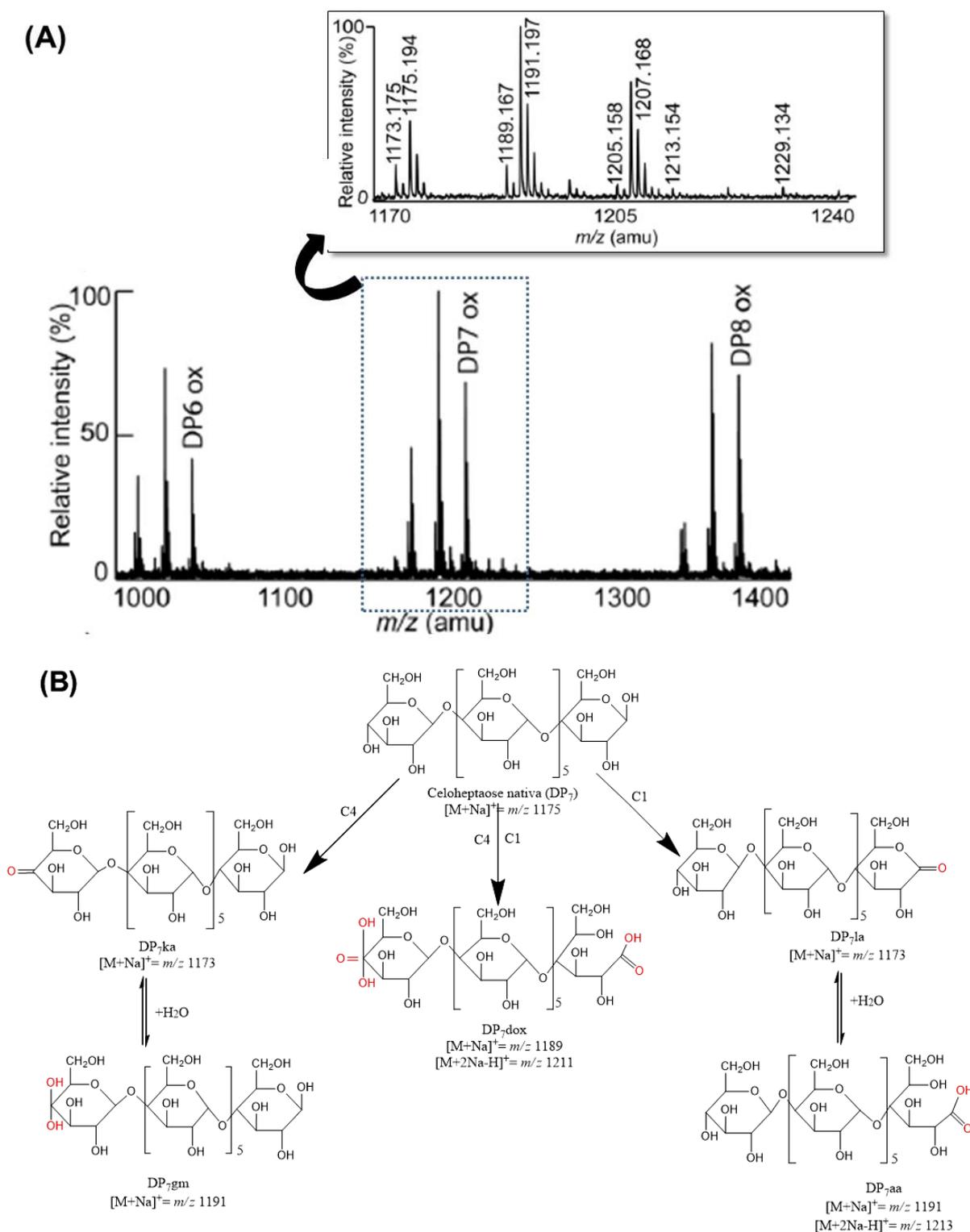


Figura 11: (A) MALDI(+)-MS dos produtos da reação da TfAA10 em substrato celulósico PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) e a (B) representação das moléculas detectadas, nos quais os eventos de oxidação estão marcados em vermelho. Adaptado das Figuras 1, S1B e S1D de Forsberg *et al.* (2014).

É importante destacar que um desafio para utilização de MALDI-TOF MS está na sobreposição de massas referentes a espécies químicas comuns, como o átomo de oxigênio e a

diferença entre um átomo de sódio e de potássio, que equivalem a 16 Da. Porém, esses eventuais “problemas” podem ser solucionados com *dopping* da amostra com diferentes sais (VAAJE-KOSLTAD *et al.*, 2010; BEY *et al.*, 2013; MARINAI, 2013; WESTERENG *et al.*, 2017).

O LC-MS também pode ser empregado para a análise dos produtos da reação de LPMOs. Colunas PGC (*Porous graphitized carbon*) e HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) podem ser utilizadas acopladas com espectrômetros de massas nessas análises. As colunas tipo PGC são versáteis podendo ser utilizadas em uma ampla faixa de pH, com alta sensibilidade utilizando eluentes com baixa força iônica. Porém esse método permite forte retenção de oligossacarídeos mais longos, limitando o estudo de oligossacarídeos intermediários. A coluna tipo HILIC pode ser útil para a separação de oligossacarídeos neutros, e de oligossacarídeos oxidados através da utilização de eluentes com alta força iônica e em pHs básicos (WESTERENG *et al.*, 2013; WESTERENG *et al.*, 2017; BOULOS e NYSTROM, 2016).

Destaca-se que cada método analítico possui vantagens e desvantagens, exigindo o emprego de uma ou mais técnicas para melhor interpretação da ação das LPMOs. Além disso, descobertas contínuas a respeito da ação dessas enzimas em diferentes substratos e a influência dos componentes envolvidos na reação (como tampão e doador de elétron) exigem um grande repertório de métodos que possam detectar uma ampla faixa dos produtos, nas diferentes condições analíticas (WESTERENG *et al.*, 2017).

Dessa forma, neste trabalho foi necessário o desenvolvimento e/ou otimização de métodos analíticos para a caracterização da atividade enzimática da LPMO de *Thermobifida fusca* (TfAA10) recombinante, em substratos celulósicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis (LQB), Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB) e Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB) da Embrapa Agroenergia, Brasília-DF.

4.1 Reagentes e soluções

Os reagentes e as soluções utilizadas neste trabalho estão listados abaixo, separados por categoria.

- ✓ Solventes e soluções: água ultrapura (obtida por sistema Millipore), acetonitrila (Lichrsolve), ácido trifluoroacético – TFA (Sigma-Aldrich), solução de ácido clorídrico 100 mM (Vetec), imidazol 500 mM (Sigma-Aldrich), solução de sulfato de cobre – CuSO_4 , 250 mM, pH 3,5 (Sigma-Aldrich), ácido fosfórico 85% (Alphatec), etanol 70% (Vetec), solução de hidróxido de sódio – NaOH 100 mM (Vetec), solução de ácido ascórbico 10 mM (Sigma-Aldrich), ácido acético glacial (Vetec), solução de cloreto de sódio 100 mM (Sigma-Aldrich), solução de cloreto de potássio 100 mM (Merck), solução de cloreto de lítio 100 mM (Vetec) e hidróxido de amônio (Merck Millipore)
- ✓ Tampões: fosfato de sódio 20 mM, pH 8,5 (Sigma-Aldrich) com cloreto de sódio 500 mM (Sigma-Aldrich), Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 (Affymetrix), Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 (Affymetrix) com cloreto de sódio 1 M (Sigma-Aldrich), citrato de sódio 100 mM pH 5,0 (Vetec), acetato de amônio 100 mM, pH 6,0 (Vetec), fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0 (Sigma-Aldrich), fosfato de sódio 100 mM, pH 6,0 (Sigma-Aldrich), fosfato-salino 100 mM, pH 6,0 (Sigma-Aldrich), acetato de sódio 100 mM, pH 5,2 (Sigma-Aldrich).
- ✓ Kit comercial: kit para quantificação de proteínas por ácido bicinonínico - BCA (*Thermo Scientific Pierce*®)
- ✓ Padrões: ácido glucurônico (Sigma-Aldrich), glicose (Sigma-Aldrich), celobiose (Sigma-Aldrich), celotriose (Sigma-Aldrich), celotetraose (Sigma-Aldrich), celopentaose (Sigma-Aldrich), celohexaose (Megazyme), albumina de soro bovino – BSA (2 mg/mL) (*Thermo*);
- ✓ Matrizes para uso nas análises por MALDI: ácido 2,5-dihidroxibenzóico – DHB (Sigma-Aldrich) e ácido sinapílico – SA (Bruker);
- ✓ Substratos: Avicel® PH-101 (Sigma-Aldrich).

4.2 Enzimas LPMO

4.2.1 Produção de enzimas

As mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) utilizadas nesse trabalho foram produzidas pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Léia C. L. Fávaro, no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB), Embrapa Agroenergia (Brasília-DF).

Duas sequências da LPMO de *Thermobifida fusca* YX (nomeada como TfAA10) foram construídas com base na sequência depositada no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com o código de acesso AAZ55306.1. A partir da sequência da LPMO bacteriana foram realizadas duas construções para a mesma proteína, uma com códon otimizado para expressão em *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) e outra com códon nativo, sendo estas denominadas no decorrer do trabalho como TfAA10-O e TfAA10-N, respectivamente (Apêndice A).

Essas duas formas da TfAA10 foram produzidas por sistema de expressão heteróloga em *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) em *Erlenmeyers* de 250 mL ou biorreatores de 1 L. A produção da enzima em *Erlenmeyers* de 250 mL foi realizada utilizando o meio BMGY (*Basal Medium Glycerol Yeast*) para obtenção do pré-inóculo e o meio BMMY (*Basal Medium Methanol Yeast*) para o cultivo da levedura, seguida da adição de metanol (0,5% v/v) a cada 24 h até 96 h de fermentação, conforme descrito por Rodrigues *et al.* (2017). A produção em biorreatores de 1 L foi realizada por meio de batelada alimentada em meio basal de sais (BSM – *Basal Salt Medium*), suplementado com solução de traço de sais – PTM1 (*Pichia Trace Medium*), conforme metodologia descrita por Ponte *et al.* (2016).

Destaca-se que a forma de obtenção desta LPMO bacteriana modelo por meio de expressão heteróloga em levedura é pioneira deste grupo de pesquisa (RODRIGUES *et al.*, 2017; SANTOS, 2017). E por isso a enzima expressa nesse sistema teve sua atividade testada neste trabalho.

4.2.2 Preparo das enzimas para os ensaios enzimáticos

As LPMOs foram avaliadas na forma de extrato bruto ou purificadas por cromatografia de afinidade (His-Tag) ou por troca iônica (DEAE-Sepharose). Todas as etapas de purificação foram realizadas pelas Dra. Kelly Barreto e Amanda Souza, no Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB).

O extrato bruto utilizado nas reações enzimáticas foi centrifugado (10.000 g por 20 min) e o sobrenadante dialisado e concentrado em Amicon *Vivaspin* de *cut off* 3 kDa (GE Healthcare) até a obtenção do volume desejado para as análises enzimáticas (~1 mL).

As duas formas da TfAA10 foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando a coluna de afinidade (HisTrap™ HP, 5 mL, GE Healthcare). Cada proteína foi primeiramente dialisada em tampão de ligação (fosfato de sódio – 20 mM e NaCl – 500 mM), aplicada na coluna de afinidade e eluída por gradiente linear de imidazol (0-500 mM), conforme metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (2017).

A enzima TfAA10-N purificada por troca iônica foi dialisada em tampão de ligação (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5), aplicada na coluna DEAE-Sepharose FF (HiTrap™ 1 mL, GE Healthcare) e eluídas por gradiente linear de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,5) com cloreto de sódio 1 M, conforme metodologia sugerida pelo fabricante GE *Healthcare*.

As frações das proteínas eluídas nas etapas de purificação foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) para confirmação da purificação. Em seguida, estas foram concentradas através de uma Amicon *Vivaspin* de *cut off* 3kDa (GE) a 5000 rpm e 4°C até obtenção do volume desejado para análise enzimática (~1 mL).

Algumas LPMOs necessitam de íons metálicos como de cobre para produzir a atividade enzimática desejada. Dessa forma, uma das LPMOs (TfAA10-N) estudadas foi saturada com solução de sulfato de cobre – CuSO₄ (excesso molar de 5x), após a etapa de purificação. Em seguida realizou-se o processo de dessalinização utilizando a coluna Hi-Trap™ *Dessalting* (GE *Healthcare*) em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,5), conforme Marinai (2013).

Todas as etapas de purificação de proteínas foram conduzidas em um sistema automatizado de purificação ÄKTA™ pure (GE *Healthcare*).

4.2.3 Determinação da quantidade de proteínas

As enzimas recombinantes utilizadas nas reações enzimáticas foram quantificadas através do método indireto por ácido bicinconínico (BCA), segundo as instruções descritas no manual do kit da *Thermo Scientific Pierce*® (*BCA Protein Assay Kit*).

Primeiramente, a solução de trabalho foi preparada a partir dos reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em tampão de citrato de sódio 100 mM, pH 5,0) e B (4% de sulfato cúprico) do *kit* comercial, numa proporção de 50:1. Em seguida, alíquotas de 25 µL de amostras proteicas foram adicionadas a

cada poço da microplaca, aos quais foram adicionados 200 μ L da solução de trabalho, e incubados a 37 °C por 30 min. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 562 nm, utilizando o tampão de citrato de sódio 100 mM como branco do equipamento. A quantidade de proteínas solúveis totais foi determinada utilizando a curva padrão de albumina de soro bovino – BSA (0,05 a 2,0 mg/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3 Preparo do substrato celulósico

Avicel® PH-101 e PASC (*Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) são exemplos de modelos de substratos celulósicos empregados em ensaios enzimáticos, no qual o primeiro representa uma celulose na forma cristalina e o outro na forma amorfa (PAYNE *et al.*, 2015). Desta forma, esses dois substratos foram utilizados nos ensaios enzimáticos com LPMOs.

O substrato celulósico PASC foi preparado a partir da Avicel® PH-101 (Sigma-Aldrich) pré-tratada quimicamente com ácido fosfórico 85%, conforme o método descrito por Zhang *et al.* (2009) e Wood (1988). Para a obtenção desse substrato, foram pesados 5 g de Avicel PH-101, sendo adicionados lentamente 50 mL de ácido fosfórico 85%. Essa suspensão foi submetida a 50 °C por 4 h em banho ultrassônico. Após o aquecimento, foram adicionados 250 mL de água destilada sob agitação vigorosa. Em seguida, foram realizadas três lavagens dessa solução com etanol 70%, mantendo o precipitado no decorrer do processo. O pH foi então ajustado para 7,0 com solução de NaOH 100 mM. Após a neutralização, realizaram-se três lavagens com água destilada, sendo o precipitado final submetido a secagem a 50°C por 24 h.

4.4 Ensaios enzimáticos

Os ensaios foram realizados conforme adaptações do método descrito por Kittl *et al.* (2012), Forsberg *et al.* (2014), Isaken *et al.* (2014), Tanghe *et al.* (2015) e Rodrigues *et al.* (2017). As duas construções gênicas da TfAA10 (TfAA10-O e TfA10-N) foram testadas em diferentes condições reacionais para investigação da ação dessas mono-oxigenases líticas de polissacarídeos em substratos celulósicos. A enzima TfAA10A-O foi inicialmente testada quanto à sua atividade em diferentes condições reacionais e em seguida estudou-se a outra construção gênica (TfAA10-N) a fim de avaliar a atividade desta LPMO expressa em *K. phaffii*.

As condições reacionais estudadas ao longo do experimento foram: concentração de enzima, do substrato e do doador de elétrons; purificação da enzima; tampões; agitação;

volume da reação e tempo reacional. Essas condições podem ser visualizadas de forma resumida no esquema apresentado na Figura abaixo e detalhadamente em Apêndice B.

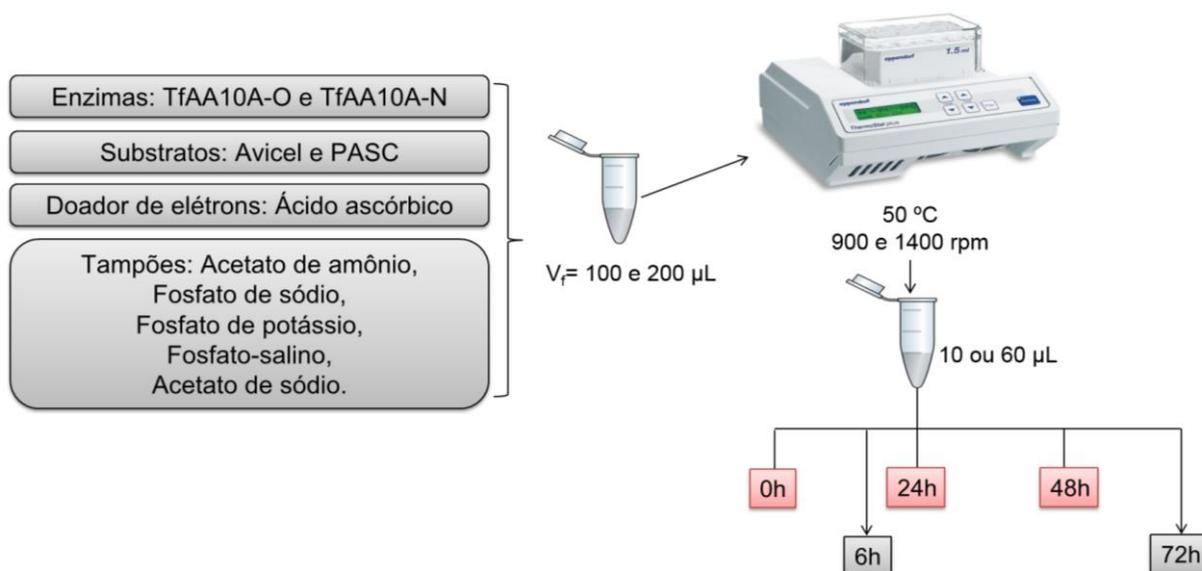


Figura 12: Esquema resumido das diferentes condições reacionais testadas para o estudo da atividade da enzima TfAA10.

A concentração da proteína em μM foi realizada a partir do peso molecular e da quantidade de proteína (mg/mL), obtida pelo método indireto de BCA, através do software online *Graphpad* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform.cfm>).

Os substratos celulósicos (Avicel® PH-101 e PASC – Vide tópico 4.3) foram utilizados na reação a partir de uma solução estoque preparada na concentração de 10 mg/mL quando a concentração final era de 2 mg/mL e preparada na concentração de 100 mg/mL quando esta era de 12 mg/mL , tendo a água como solvente. E o ácido ascórbico foi utilizado como doador de elétrons, a partir de uma solução estoque de 10 mM .

O volume da reação (100 e $200 \mu\text{L}$) e a agitação (900 e 1400 rpm) foram alterados no decorrer dos ensaios para permitir melhor aeração do sistema, e, conseqüentemente, maior quantidade de oxigênio para atuação enzimática. Os tempos de análise da reação foram, na maioria dos ensaios, de 0 , 24 e 48 h , sendo adicionados tempos reacionais intermediários (6 h) e superior a esses (72 h) para melhor investigação da ação enzimática ao longo do tempo.

Como controle das reações foram realizados ensaios na presença e ausência de enzima (controle negativo), combinados com adição ou não de doador de elétrons. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em microtubos de 2 mL . Estes foram incubados, em termoagitador, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e na devida agitação até o tempo final da reação. Alíquotas de $10 \mu\text{L}$ foram retiradas nos tempos iniciais (0 h), intermediário e final da reação. Para isso os tubos

foram homogeneizados em vórtex por 1 minuto, centrifugados a 10.000 g por 5 min, para obtenção do sobrenadante (que contém os oligossacarídeos solúveis). Destaca-se que quando as amostras foram analisadas através dos dois métodos analíticos foi necessário retirar uma alíquota de 60 µL.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Análise das enzimas por MALDI-TOF MS

O perfil das enzimas empregadas nos ensaios enzimáticos foi avaliado por MALDI-TOF MS (*UltrafleXtreme, Bruker Daltonics*) conforme metodologia de Barros (2016). As amostras foram preparadas na placa de aço MTP 384 *target plate ground steel BC (Bruker Daltonics)* por meio do método *dried droplet*, utilizando como matriz o ácido sinapínico (SA – *sinapinic acid*) na concentração de 20 mg/mL, preparado em TA30 (solução contendo 30% de acetonitrila e 70% de água, com aditivo de 0,1% de TFA – ácido trifluoroacético). Diferentes proporções entre amostra e matriz foram testadas (1:3, 1:5 e 1:10).

Os dados de massas foram adquiridos no modo linear positivo do analisador, na faixa m/z 10-80k, com laser no modo *5-ultra*, intensidade de 80-93%, 1000 *shots*, frequência de 1000 e ganho de detector de 84x. Para calibração do equipamento, foi utilizada solução de calibração de proteínas do fabricante (*Protein Calibration Standard, Bruker Daltonics*). Os dados foram obtidos utilizando o *software FlexControl* versão 3.4 (*Bruker Daltonics*) e processados utilizando o *software Flexanalysis* versão 3.4 (*Bruker Daltonics*).

4.5.2 Análise dos produtos da reação enzimática

As alíquotas do sobrenadante dos ensaios enzimáticos foram imediatamente analisadas por espectrometria de massas, MALDI-TOF MS e UHPLC-ESI-MS.

4.5.2.1 Método analítico baseado em MALDI-TOF MS

Os produtos das reações enzimáticas foram analisados utilizando o ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (DHB) como matriz. Foram testados métodos de plaqueamento (*two layer* e *dried droplet*), concentrações da matriz (20 e 9 mg/mL), proporção de amostra-matriz (1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5 e 1:3) e presença ou ausência de cloreto de sódio (NaCl). Estes

parâmetros se alteraram no decorrer das análises, de modo a permitir a melhor ionização dos analitos de interesse.

Os dados de massas foram adquiridos no modo refletor positivo do analisador, com faixa de massa m/z 0-7000 (*Full Scan*) e em seguida de m/z 500-2000, laser no modo *small*, *large* ou *ultra*, intensidade 10-76%, 400-1000 *shots*, frequência de 1000-2000 Hz, ganho de detector de 3,4-5,0x e modo defletor.

Todas as amostras foram aplicadas, em duplicata, na placa de aço MTP 384 *target plate ground steel BC (Bruker Daltonics)*. Para calibração do equipamento, foi utilizada solução de calibração de peptídeos do fabricante (*Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics*), que possui a mesma faixa de massa a ser analisada. Os espectros de massas foram obtidos utilizando o *software FlexControl* versão 3.4 (*Bruker Daltonics*) e processados utilizando o *software Flexanalysis* versão 3.4 (*Bruker Daltonics*).

4.5.2.2 Método analítico baseado em UHPLC-ESI-MS

O método analítico foi desenvolvido a partir de adaptações do método descrito por Boulos e Nystrom (2016). O método LC-MS foi realizado utilizando o sistema UHPLC (Modelo Prominence LC30AD, Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Q-TOF equipado com fonte de ionização por eletrospray – ESI (Modelo Maxis 4G, Bruker).

Para o desenvolvimento desse método analítico foram utilizados padrões de celooligosacarídeos, substratos celulósicos (Avicel PH 101 e PASC) e também amostras reais (Tabelas 1 e 2). Os padrões de oligossacarídeos utilizados foram ácido glucurônico, glicose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose (Sigma-Aldrich) e celohexaose (Megazyme), sendo todos preparados a partir de uma solução estoque de 500 $\mu\text{g/mL}$. As celulosas do tipo Avicel® PH-101 (Sigma-Aldrich) e PASC (item 4.3) foram preparadas a partir de uma solução estoque de 10 mg/mL . Destaca-se que devido a insolubilidade desses substratos (Avicel® PH-101 e PASC) e para aplicação de uma amostra sem partículas sólidas, tais soluções foram centrifugadas (14.000 rpm, 5min), e o sobrenadante foi coletado para ser analisado, da mesma forma que foi realizado com os produtos da reação enzimática.

A partir das soluções estoques foram preparadas soluções nas concentrações desejadas utilizando como solvente acetonitrila:água (ACN:H₂O) na proporção de 3:1, com adição de 0,1% de hidróxido de amônio. Inicialmente os padrões de oligossacarídeos e os substratos celulósicos foram analisados por DIMS (*Direct Infusion Mass Spectrometry*) nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em seguida essas amostras foram

analisadas por UHPLC-ESI-MS na concentração de 20 µg/mL para os padrões de oligossacarídeos e nas concentrações de 50, 100 e 500 µg/mL para os substratos celulósicos. Sendo que as soluções foram inicialmente preparadas *em vials* de 1,5 mL, em um volume final de 1 mL e em seguida com a utilização de *insert* de 400 µL com volume final de 200 µL tendo a vista o pequeno volume de amostras as quais deveriam ser analisadas.

Para separação dos analitos, utilizou-se a cromatografia líquida com interação hidrolífica (HILIC) através do emprego da coluna BEH Amida (2,1 x 150 mm x 1,7 µm, Waters) a 35°C, com eluente A (água com hidróxido de amônio 0,1%) e eluente B (acetonitrila com hidróxido de amônia 0,1 %), fluxo de 0,17 mL/min. Ao longo das análises as condições cromatográficas (tempo e gradiente de eluição) foram alteradas de modo a permitir melhor análise dos compostos de interesse.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo e negativo, configurado para DIMS com voltagem do capilar de 4,5 kV, pressão do nebulizador 0,4 Bar, gás de secagem a 5,0 L/min a 200 °C e para LC-MS numa voltagem do capilar de 4,5 kV, pressão do nebulizador 4,0 Bar, gás de secagem a 9,0 L/min a 200 °C. O *tunning* do equipamento foi otimizado para as faixas de massa m/z 100-2000, no qual o equipamento foi calibrado com formiato de sódio (1 mM). Os dados de LC-MS foram adquiridos através dos softwares *HyStar* (Shimadzu) e *otof Control* versão 4.0 (Bruker) e processados através do software *Data Analysis* versão 4.2 (Bruker).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do perfil das proteínas por MALDI-TOF MS

As enzimas produzidas (TfAA10-O e TfAA10-N), que foram submetidas aos ensaios enzimáticos tiveram seu perfil proteico analisado por MALDI-TOF MS.

Nota-se que a enzima TfAA10-O produzida em *Erlenmeyer* e purificada por afinidade (His-Tag) apresentou massa molecular $[M+H]^+$ de aproximadamente 27 kDa (Figura 13). Também podem ser visualizados os valores m/z referentes à molécula duplamente carregada $[M+2H]^{2+}$ (~13 kDa), e também a forma de dímero $[2M+H]^+$ (~54 kDa).

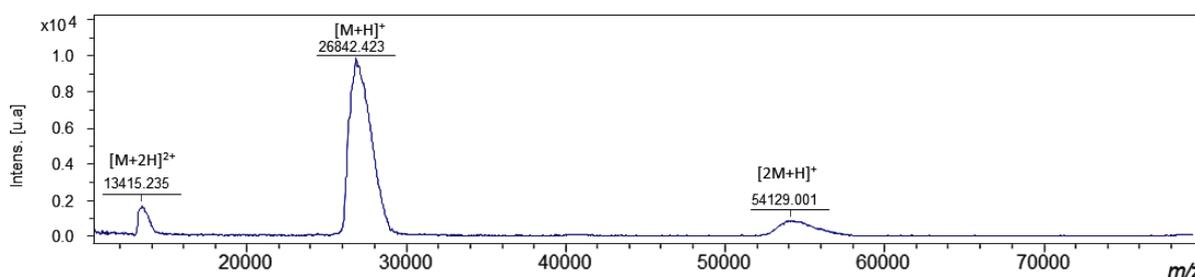


Figura 13: MALDI(+)-MS da proteína TfAA10-O produzida em *Erlenmeyer* e purificada por afinidade (His-Tag), sendo aplicada na proporção de 1:3 com a matriz de ácido sinápico.

A partir da sequência da proteína recombinante TfAA10 (Apêndice A) foi possível estimar o tamanho molecular desta através do *Protparam* do ExPASy (*SIB Bioinformatics Resource Portal*). Para a TfAA10 foi estimado um valor de 21 kDa, podendo ter esse valor superior ao calculado dependendo do organismo utilizado para expressão.

Nesse caso, as enzimas foram expressas em um microrganismo eucarioto (levedura - *Komagataella phaffii*, antiga *Pichia pastoris*) que são propensos a realizar modificações pós-traducionais nas proteínas expressas. A TfAA10 possui dois possíveis sítios para N-glicosilações e três sítios para O-glicosilações (Apêndice C). Isso justifica o maior valor obtido para a massa molecular da enzima estudada (TfAA10-O).

O perfil da LPMO bacteriana TfAA10-N também foi avaliado, quando produzida em *erlenmeyer* e em biorreator, conforme mostrado na Figura 14.

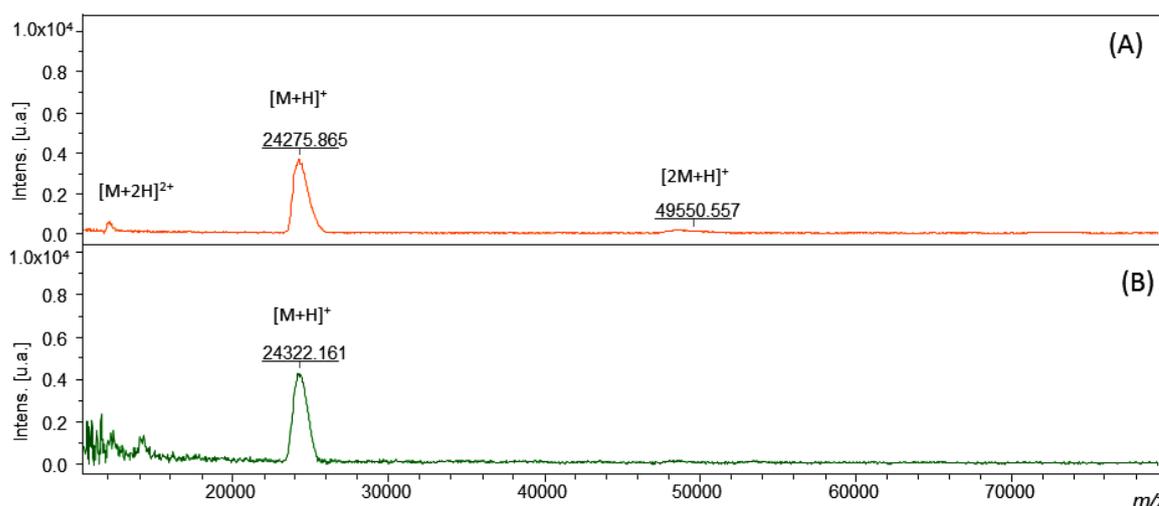


Figura 14: MALDI(+)-MS da proteína TfAA10-N produzida em *Erlenmeyer* (A) e em biorreator (B), purificadas por afinidade (His-Tag). Todas as proteínas foram aplicadas na proporção de 1:3 com a matriz de ácido sinapílico.

Na análise da proteína TfAA10-N produzida em *Erlenmeyer* (Figura 14A) e em biorreator (Figura 14B) foram detectados íons que sugerem que a massa desta proteína seja de aproximadamente 24 kDa. Essa nova proteína utilizou o códon nativo de modo a favorecer menor quantidade de glicosilações, evidenciando o menor tamanho da proteína em relação á proteína construída com códon otimizado (TfAA10-O).

Vale destacar que essas enzimas possuem a mesma sequência de aminoácidos, geradas a partir de códons diferentes. Isso pode ter favorecido a formação de isoformas diferentes, visualizadas com tamanhos moleculares diferentes (Figuras 13 e 14). Essas isoformas possivelmente possuem diferentes propriedades estruturais, que estão diretamente relacionadas a sua funcionalidade.

Valores m/z referentes a molécula duplamente carregada $[M+2H]^{2+}$ e ao dímero $[2M+H]^+$ também foram verificados na proteína TfAA10-N produzida em *erlenmeyer* (Figura 14A) Já na proteína TfAA10-N produzida em biorreator (Figura 14B) não foi possível verificar a presença dos íons referente ao dímero e ao duplamente carregado, tendo em vista a baixa intensidade do sinal da enzima de interesse e também maior sinal-ruído.

A análise das enzimas TfAA10 por MALDI-TOF MS também permitiu confirmar a pureza das proteínas empregadas nos ensaios de hidrólise enzimática. Nessas análises (Figuras 13 e 14) detectou-se íons referentes a apenas uma proteína, o que confirma que a etapa de purificação realizada para cada enzima avaliada foi eficiente. Estes resultados utilizando MALDI-TOF MS para confirmação da pureza de proteínas confirmam que esta

técnica é uma alternativa ou complementa as análises por SDS-PAGE, tradicionalmente empregadas.

5.2 Análise dos produtos da reação das LPMOs

Para a interpretação dos íons encontrados nos produtos das reações enzimáticas utilizou-se os valores m/z teóricos dos celo-oligossacarídeos com n graus de polimerização (DP n , com n = número de glicoses) na forma protonada $[M+H]^+$ e diferentes adutos, como mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores m/z dos prováveis celo-oligossacarídeos encontrados após a ação das LPMOs.

DP n	Fórmula molecular	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[M+Li]^+$	$[M+K]^+$
DP1	C₆H₁₂O₆	181,071	203,053	219,027	187,079	198,098
DP1aa/gm	C ₆ H ₁₂ O ₇	197,066	219,048	235,022	203,074	214,093
DP1la/ka	C ₆ H ₁₀ O ₆	179,056	201,038	217,011	185,064	196,082
DP1dox	C ₆ H ₁₀ O ₇	195,050	217,032	233,006	201,059	212,077
DP2	C₁₂H₂₂O₁₁	343,124	365,106	360,151	349,132	381,080
DP2aa/gm	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂	359,119	381,101	376,146	365,127	397,075
DP2la/ka	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₁	341,108	363,090	358,135	347,117	379,064
DP2dox	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₂	357,103	379,085	374,130	363,111	395,059
DP3	C₁₈H₃₂O₁₆	505,177	527,159	522,203	511,185	543,133
DP3aa/gm	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₇	521,172	543,154	538,198	527,180	559,128
DP3la/ka	C ₁₈ H ₃₀ O ₁₆	503,161	525,143	520,188	509,169	541,117
DP3dox	C ₁₈ H ₃₀ O ₁₇	519,156	541,138	536,183	525,164	557,112
DP4	C₂₄H₄₂O₂₁	667,230	689,212	684,256	673,238	705,186
DP4aa/gm	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₂	683,225	705,207	700,251	689,233	721,180
DP4la/ka	C ₂₄ H ₄₀ O ₂₁	665,214	687,196	682,241	671,222	703,170
DP4dox	C ₂₄ H ₄₀ O ₂₂	681,209	703,191	698,235	687,217	719,165
DP5	C₃₀H₅₂O₂₆	829,283	851,264	846,309	835,291	867,238
DP5aa/gm	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₇	845,277	867,259	862,304	851,286	883,233
DP5la/ka	C ₃₀ H ₅₀ O ₂₆	827,267	849,249	844,293	833,275	865,223
DP5dox	C ₃₀ H ₅₀ O ₂₇	843,262	865,244	860,288	849,270	881,218
DP6	C₃₆H₆₂O₃₁	991,335	1013,317	1008,362	997,344	1029,291
DP6aa/gm	C ₃₆ H ₆₂ O ₃₂	1007,330	1029,312	1024,357	1013,338	1045,286
DP6la/ka	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₁	989,320	1011,302	1006,346	995,328	1027,276
DP6dox	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₂	1005,315	1027,297	1022,341	1011,323	1043,270
DP7	C₄₂H₇₂O₃₆	1153,388	1175,370	1170,415	1159,396	1191,344
DP7aa/gm	C ₄₂ H ₇₂ O ₃₇	1169,383	1191,365	1186,410	1175,391	1207,339
DP7la/ka	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₆	1151,373	1173,354	1168,399	1157,381	1189,328
DP7dox	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₇	1167,367	1189,349	1184,394	1173,376	1205,323
DP8	C₄₈H₈₂O₄₁	1315,441	1337,423	1332,468	1321,449	1353,397
DP8aa/gm	C ₄₈ H ₈₂ O ₄₂	1331,436	1353,418	1348,462	1337,444	1369,392

DP8la/ka	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₁	1313,425	1335,407	1330,452	1319,434	1351,381
DP8dox	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₂	1329,420	1351,402	1346,447	1335,428	1367,376
DP9	C₅₄H₉₂O₄₆	1477,494	1499,476	1494,520	1483,502	1515,450
DP9aa/gm	C ₅₄ H ₉₂ O ₄₇	1493,489	1515,471	1510,515	1499,497	1531,445
DP9la/ka	C ₅₄ H ₉₀ O ₄₆	1475,478	1497,460	1492,505	1481,486	1513,434
DP9dox	C ₅₄ H ₉₀ O ₄₇	1491,473	1513,455	1508,500	1497,481	1529,429
DP10	C₆₀H₁₀₂O₅₁	1639,547	1661,529	1656,573	1645,555	1677,503
DP10aa/gm	C ₆₀ H ₁₀₂ O ₅₂	1655,542	1677,523	1672,568	1661,550	1693,497
DP10la/ka	C ₆₀ H ₁₀₀ O ₅₁	1637,531	1659,513	1654,558	1643,539	1675,487
DP10dox	C ₆₀ H ₁₀₀ O ₅₂	1653,526	1675,508	1670,552	1659,534	1691,482

aa=ácido aldônico, gm=gemdiol, la=lactona, ka=cetoaldose e dox=dupla oxidação.

Os dados escritos na tabela 1 foram gerados a partir da fórmula molecular dos possíveis produtos da reação entre celulose e LPMOs (BENNATI-GRANIER *et al.*, 2015; BEY *et al.*, 2015; FORSBERG *et al.*, 2011; FORSBERG *et al.*, 2014; FROMMHAGEN *et al.*, 2015; GHATGE *et al.*, 2015; WESTERENG *et al.*, 2011) e do *Compass isotope pattern calculator* (Bruker).

Os celo-oligossacarídeos nativos (não-oxidados) são mostrados em negrito (Tabela 1) e foram representados com a coloração azul nos espectros de massas mostrados no decorrer do texto. Os demais valores *m/z* se referem aos celo-oligossacarídeos oxidados nas formas de ácido aldônico (aa), gemdiol (gm), lactona (la), cetoaldose (ka) ou duplamente oxidado (dox), cuja forma genérica de cada DP_n (Figura 7). Todos os valores *m/z* correspondentes as formas oxidadas foram representadas na coloração vermelha nos espectros de massas e os íons dúbios em laranja.

5.2.1 Análise dos produtos das reações da TfAA10-O por MALDI-TOF MS

Inicialmente a atividade da TfAA10-O foi avaliada nas condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições da reação enzimática com a TfAA10-O, produzida em *Erlenmeyer* e purificada por His-Tag.

Reagentes	Ensaio nº. 1	Controle	Ensaio nº. 2	Controle
Enzima	TfAA10-O (1 µM)	-	TfAA10-O (1µM)	-
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	Avicel (2 mg/mL)	Avicel (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)			

*Volume final de reação = 200 µL, Agitação= 900 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 24 e 48 h..

O perfil dos produtos da reação da LPMO bacteriana TfAA10-O em PASC e Avicel nos tempos de reação 0, 24 e 48 h foram analisados por MALDI-TOF MS. Nessa análise as amostras foram aplicadas pelo método *two layer*, na proporção de 1:3, com a matriz DHB (20 mg/mL). Os espectros de massas foram adquiridos no modo refletor positivo do analisador, com faixa de massa m/z 0-7000 (*Full Scan*) e m/z 500-2000, com laser no modo *small*, intensidade 60-76%, 400 *shots*, frequência de 1000, ganho de detector de 3,4 e modo defletor. O perfil dos produtos da reação enzimática nos substratos celulósicos pode ser visualizado na Figura 15.

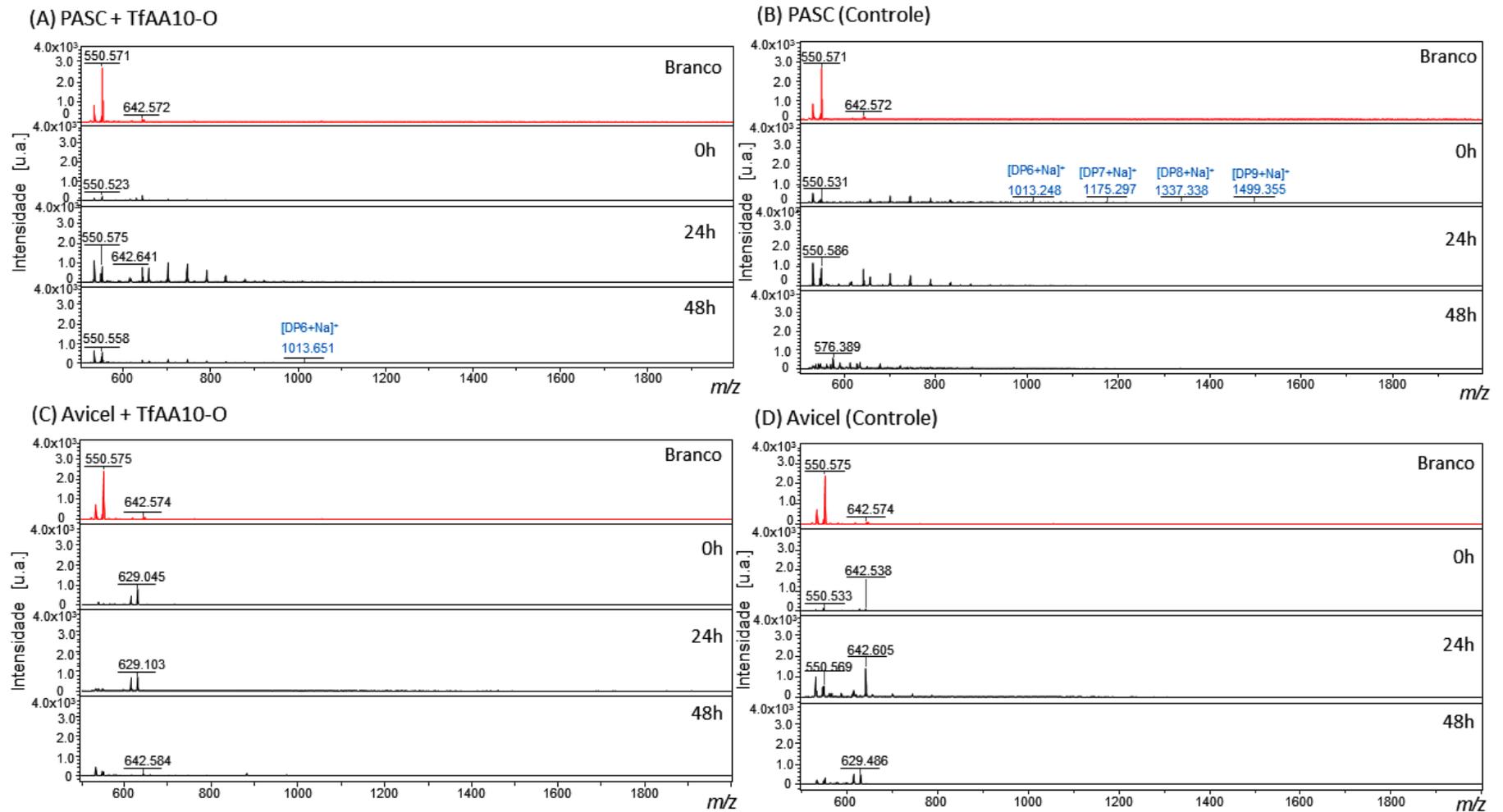


Figura 15: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da TfAA10-O em PASC (A) e Avicel (C) e os respectivos controles negativos (B- PASC na ausência da enzima e D - Avicel na ausência da enzima) ao longo dos tempos reacionais 0, 24 e 48 h. Em vermelho é mostrado o espectro referente a matriz DHB, branco da análise.

Os produtos detectados (em azul na Figura 15) se referem a oligossacarídeos nativos, com diferentes graus de polimerização (DPn), sendo eles DP6 (m/z 1013), DP7 (m/z 1175), DP8 (m/z 1337) e DP9 (m/z 1499). Esses oligossacarídeos nativos foram detectados na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$ e estão presentes principalmente quando se utilizou a PASC como substrato (Figura 15B, em 0h). Isso se deve ao fato desse substrato ter sofrido um processo de pré-tratamento químico, tornando-o menos cristalino e com menor grau de polimerização, e consequentemente sendo mais acessível ao ataque enzimático (ZHANG *et al.*, 2010; PAYNE *et al.*, 2015). Apesar dessa diferença entre os substratos nenhum produto oxidado foi detectado, indicando que as LPMOs avaliadas não apresentaram atividade oxidativa nas condições testadas.

Porém, tendo em vista a baixa intensidade dos íons apresentada neste ensaio (Figura 15) foi necessário otimizar o método analítico por MALDI-TOF MS para melhor detecção dos produtos da reação enzimática de LPMOs em substratos celulósicos (Avicel e PASC).

5.2.1.1 Otimização de método para análise por MALDI-TOF MS

Dois padrões de oligossacarídeos nativos, celobiose e celohexaose, foram testados em diferentes concentrações para otimização do método analítico. Além disso, foi verificada a influência da adição de cloreto de sódio na ionização dos analitos, tendo em vista que esse sal é utilizado na análise de carboidratos e normalmente favorece a ionização desses compostos. Os espectros de massas dos padrões de oligossacarídeos celobiose ($C_{12}H_{22}O_{11}$, 365 Da) e celohexaose ($C_{36}H_{62}O_{31}$, 1013 Da) analisados nas condições descritas podem ser visualizados na figura abaixo.

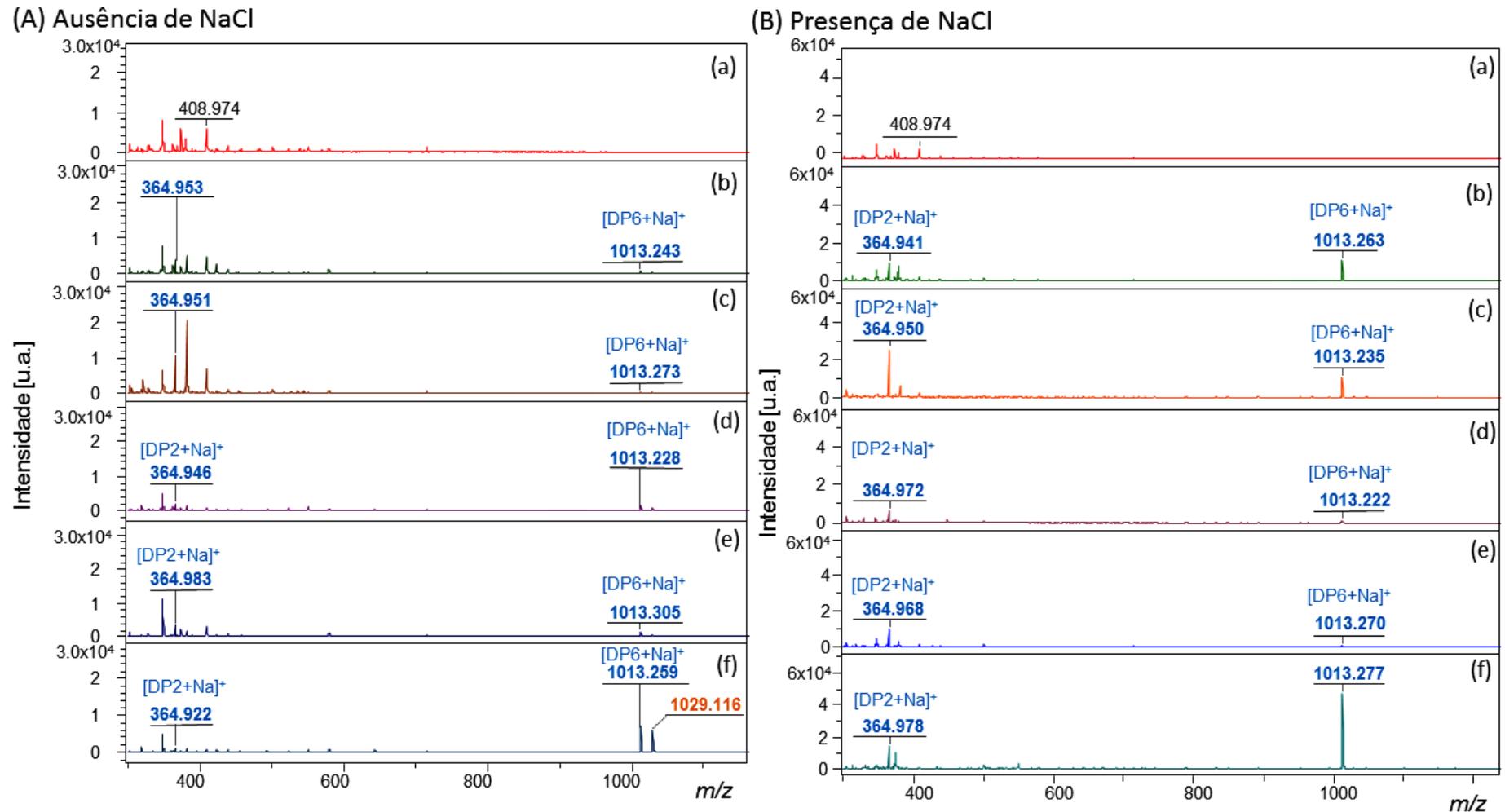


Figura 16: MALDI(+)-MS dos oligossacarídeos (celobiose – DP2 e celohexaose – DP6) nas concentrações de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (b), 125 $\mu\text{g/mL}$ (c), 250 $\mu\text{g/mL}$ (d), 500 $\mu\text{g/mL}$ (e) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (f), na ausência (A) e na presença (B) de NaCl. No qual o branco (apenas a matriz DHB) refere-se ao espectro em vermelho (a), e os valores m/z em azul refere-se aos íons sodiados e em laranja íons potassidados dos padrões analisados, sendo $[\text{DP2} + \text{Na}]^+ \sim 365$ (Bennati-Granier *et al.*, 2015), $[\text{DP6} + \text{Na}]^+ \sim 1013$ e $[\text{DP6} + \text{K}]^+$ ou $[\text{DP6aa} + \text{Na}]^+ \sim 1029$ (Westereng *et al.*, 2011; Bey *et al.*, 2013; Forsberg *et al.* 2011 e Ghatge *et al.* 2015).

A detecção de oligossacarídeos mesmo em concentrações baixas (62,5 µg/mL) foi possível por meio do uso do MALDI(+)-MS (Figura 16). Os padrões foram detectados na maioria dos casos como adutos de sódio $[M+Na]^+$, m/z 365 (celobiose) e m/z 1013 (celohexaose) (Figura 16A e B), mas também o íon m/z 1029 (Figura 16A) nos casos que não se utilizou o cloreto de sódio. O íon m/z 1029 (em laranja na Figura 16A) pode ter duas interpretações: $[DP6aa+Na]^+$ que refere-se a um produto oxidado esperado na reação enzimática com LPMOs ou a $[DP6+K]^+$ um oligossacarídeo nativo na forma de aduto de potássio conforme ilustrado na Figura 17.

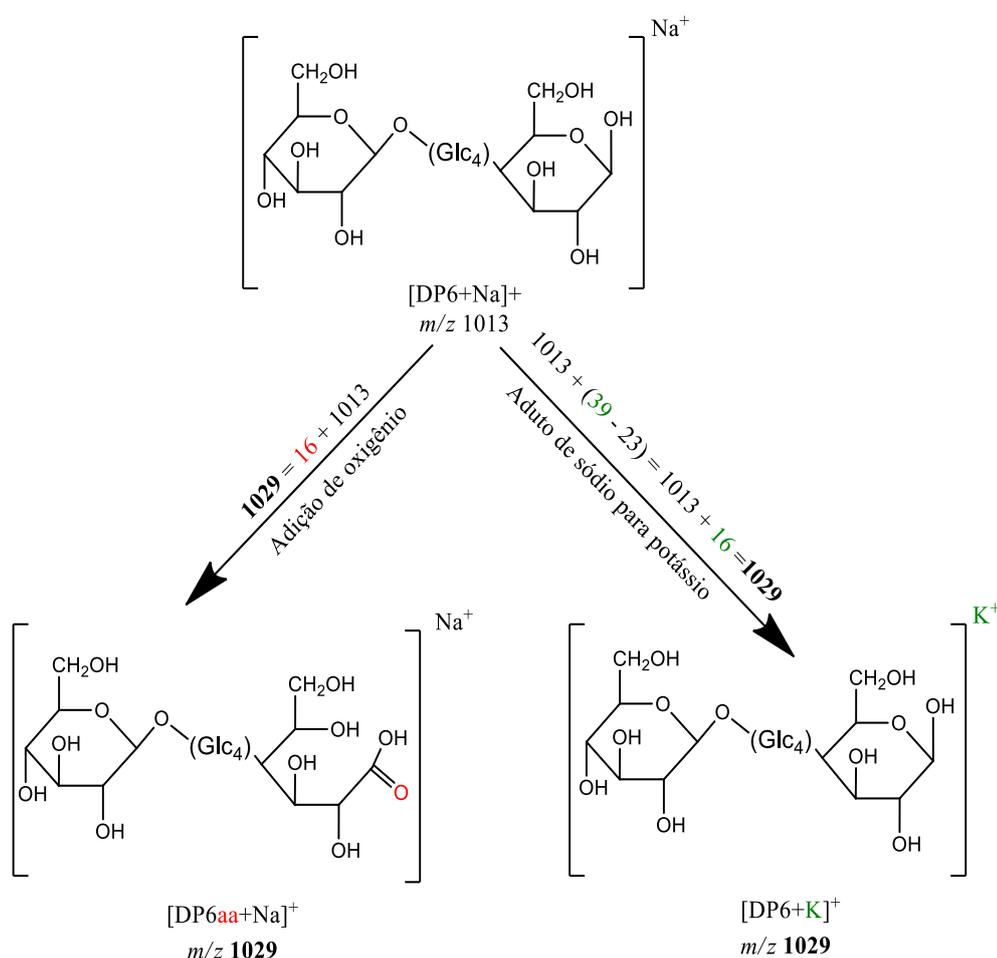


Figura 17: Estruturas químicas dos íons referentes ao aduto de sódio da celohexaose $[DP6+Na]^+$ e dos possíveis íons gerados no processo de ionização, $[DP6aa+Na]^+$ e $[DP6+K]^+$. Adaptada de Teixeira *et al.*, (2017).

Nota-se que a diferença das massas entre os adutos de sódio (m/z 1013) e de potássio (m/z 1029) é de 16 Da, que, por sua vez, também pode se referir a um átomo de oxigênio, íon $[DP6aa+Na]^+$ (m/z 1029) (Figura 17). Ressalta-se ainda que a correta interpretação desses íons

é crucial para a determinação da atividade de enzimas LPMOs nas reações enzimáticas. Isso porque, se o íon m/z 1029 for detectado na alíquota após a reação enzimática, o mesmo pode ser referir ao oligossacarídeo oxidado na forma de ácido aldônico na forma de aduto de sódio $[DP6aa+Na]^+$, sugerindo atividade enzimática. No entanto, o mesmo íon (m/z 1029) pode ser referir ao oligossacarídeo não oxidado na forma de aduto de potássio $[DP6 + K]^+$. Nessas condições, em que está sendo avaliado um padrão de oligossacarídeo, esse íon (m/z 1029, Figura 16A) foi a celohexaose potassada $[DP6+K]^+$, pois não houve a inserção da enzima capaz de oxidar o oligossacarídeo.

Outro resultado observado foi que a adição de cloreto de sódio aumentou a ionização de forma expressiva (Figura 16B em comparação com A) em todas as concentrações avaliadas e de ambos os oligossacarídeos estudados. Além da maior intensidade dos íons de interesse (Figura 16, em azul), a adição desse sal (NaCl) reduz a intensidade de adutos de potássio (Figura 16, em laranja). Desta forma, a adição desse sal se mostra como importante para reduzir a intensidade desses íons dúbios e foi incluída nas análises posteriores. Além da adição de cloreto de sódio, os parâmetros instrumentais (abertura e intensidade do laser) foram ajustados para permitir maior intensidade dos íons de interesse, quando analisados por MALDI(+)-TOF MS.

A partir desse método analítico otimizado para detecção de oligossacarídeos, ou seja, produtos esperados nas reações com LPMOs, outros ensaios enzimáticos foram realizados para avaliação da ação enzimática da TfAA10-O.

5.2.1.2 *Análise do produto da reação de LPMOs após otimização do método de MALDI-TOF MS*

Ensaio com a LPMO TfAA10-O em Avicel e PASC foram novamente realizados, conforme descritos na Tabela 2e analisados com o método de MALDI-TOF MS otimizado. Nesse novo método analítico, as amostras foram aplicadas com adição de cloreto de sódio (2,5 mM) para permitir melhor ionização dos produtos da reação. Além disso, os parâmetros de laser empregado foram no modo *large* com intensidade 50-60%. Os demais parâmetros analíticos utilizados foram mantidos, conforme o método anterior (vide item 5.2.1).

O perfil dos produtos da reação da TfAA10-O nos substratos celulósicos, Avicel e PASC, são mostrados na Figura 18.

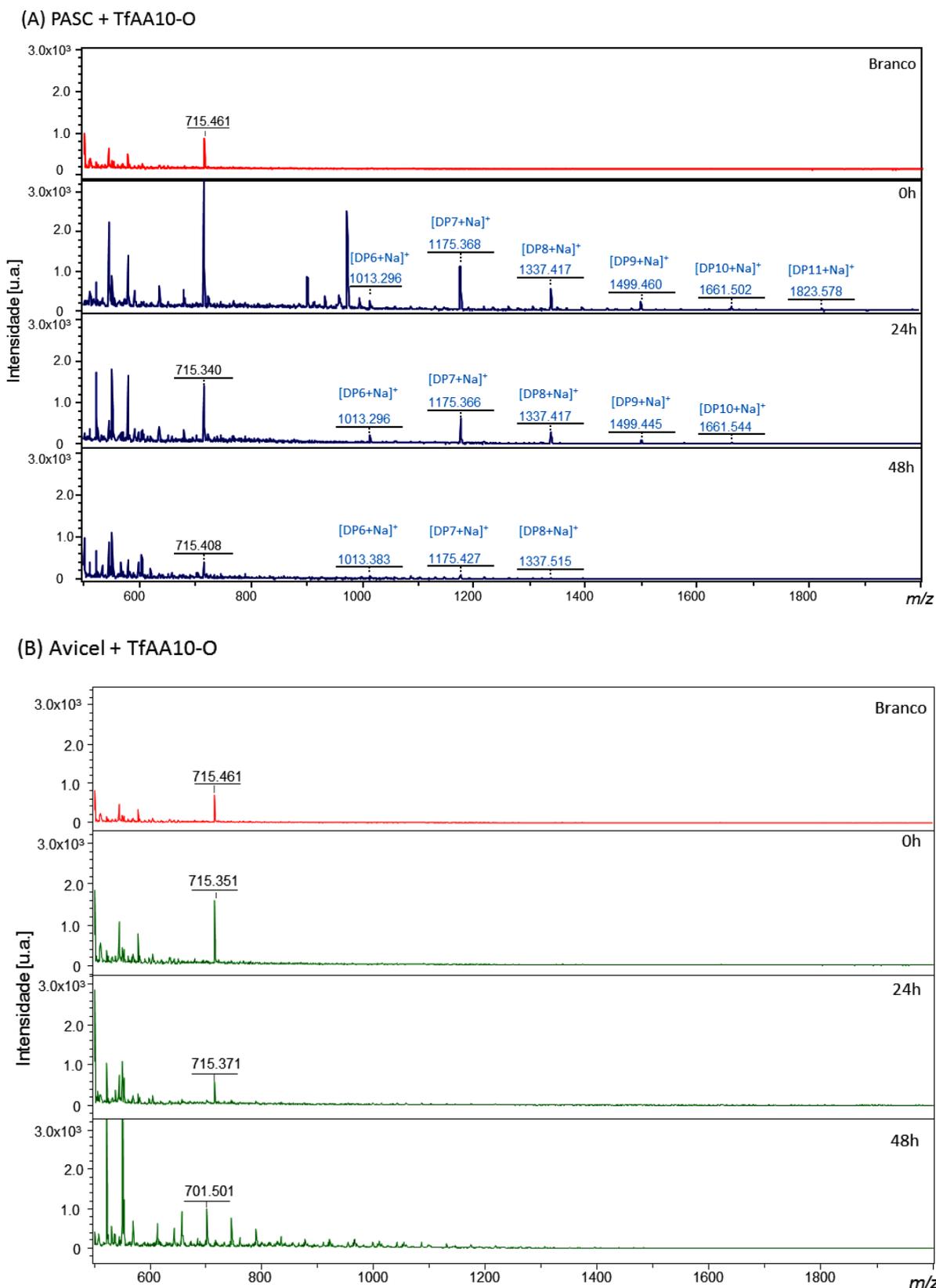


Figura 18: MALDI(+)-MS dos produtos da reação de 1 μM de LPMO TfAA10-O em 2 mg/mL de PASC (A) e Avicel (B) ao longo dos tempos de reação (0, 24 e 48 h). Esse ensaio ocorreu a 50°C, 1400 rpm e com adição de ácido ascórbico (2 mM) como doador de elétrons. Em azul são mostrados os valores m/z referentes a oligossacarídeos nativos (DP n) com aduto de sódio [DP n +Na]⁺. Em vermelho é mostrado o espectro referente a matriz DHB, branco da análise.

Houve um aumento significativo na intensidade dos íons referentes aos oligossacarídeos comparados com as análises anteriores. Ao observar os produtos da reação em PASC (Figura 18A) é possível perceber alguns valores de m/z referentes à DPs com adutos de sódio $[DP_n+Na]^+$, sendo eles m/z 1013, 1175, 1337, 1499, 1661 e 1823 referentes a DP6, DP7, DP8, DP9, DP10 e DP11, respectivamente (representados em azul na figura 18A). Esses oligossacarídeos foram encontrados nas reações desde o tempo inicial (0h). No entanto, nenhum íon referente aos oligossacarídeos oxidados foi detectado nestas análises.

Nas análises utilizando o substrato Avicel (Figura 18B), no entanto, nenhum íon referente a oligossacarídeo foi detectado. A celulose na forma cristalina, como a Avicel, pode ser utilizada como substrato para reações com LPMOs, tendo em vista que essas enzimas são capazes de auxiliar na descristalização da celulose através da clivagem oxidativa. Porém, a utilização de substratos celulósicos na forma amorfa, como a PASC, pode facilitar a ação enzimática além de melhorar a visualização dos produtos da reação. Portanto, tendo em vista a presença de oligossacarídeos nativos em PASC, este substrato demonstrou ser mais adequado para os experimentos de ensaios enzimáticos comparada a Avicel.

Com estas condições enzimáticas testadas, não foi possível visualizar os oligossacarídeos oxidados provenientes da reação da LPMO, mesmo após a otimização do método analítico. Sendo assim, foi necessário um planejamento experimental modificando as condições reacionais: tampão, concentração de enzima, concentração do doador de elétrons (ácido ascórbico), para que a reação enzimática ocorresse, pois a partir dos dados obtidos até o momento, a enzima está inativa nas condições testadas.

5.2.1.3 Otimização das condições reacionais enzimáticas

Diferentes reações foram realizadas modificando condições experimentais (dos ensaios da Tabela 02). Para esses ensaios foram utilizados a celulose do tipo PASC (2 mg/mL) como substrato, o ácido ascórbico como doador de elétrons (nas concentrações de 1 mM e 2 mM), a enzima nas concentrações de 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M e 10 μ M e quatro tampões (acetato de amônio, fosfato de sódio, fosfato de potássio e bifosfato de sódio – 5 mM, pH 6,0), como mostrados na Tabela abaixo.

Tabela 3: Condições da reação enzimática com a TfAA10-O, produzida em *Erlenmeyer* e purificada por His-Tag, combinando diferentes concentrações de enzima e ácido ascórbico e tampões reacionais.

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-O (1 μ M)	TfAA10-O (1 μ M)		
	TfAA10-O (2 μ M)	TfAA10-O (2 μ M)	-	-
	TfAA10-O (5 μ M)	TfAA10-O (5 μ M)		
	TfAA10-O (10 μ M)	TfAA10-O (10 μ M)		
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)
Doador de elétrons	AA* (1 mM) AA* (2 mM)	-	AA* (1 mM) AA* (2 mM)	-
Tampão (5 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio	Acetato de amônio	Acetato de amônio	Acetato de amônio
	Fosfato de potássio	Fosfato de potássio	Fosfato de potássio	Fosfato de potássio
	Fosfato de sódio	Fosfato de sódio	Fosfato de sódio	Fosfato de sódio
	Fosfato salino	Fosfato salino	Fosfato salino	Fosfato salino

*AA= Ácido ascórbico; **Volume final de reação = 100 μ L, Agitação= 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 6, 24 e 48 h..

Os ensaios foram realizados combinando todas as variáveis apresentadas e com um tampão por vez. Ensaios na ausência de enzima, com e sem doador de elétrons, foram utilizados como controle. Os produtos da reação foram analisados por MALDI-TOF MS nos tempos 0 h, 6 h, 24 h e 48 h.

O perfil dos oligossacarídeos provenientes do substrato celulósico PASC não se alterou ao longo dos tempos de incubação (0 a 48 horas), nem nas diferentes concentrações de enzima e de ácido ascórbico. Porém, foi possível notar a influência dos tampões empregados no perfil dos oligossacarídeos. Para a demonstração da influência dos tampões de incubação, foram considerados os perfis do tempo zero, conforme mostrados na Figura 19.

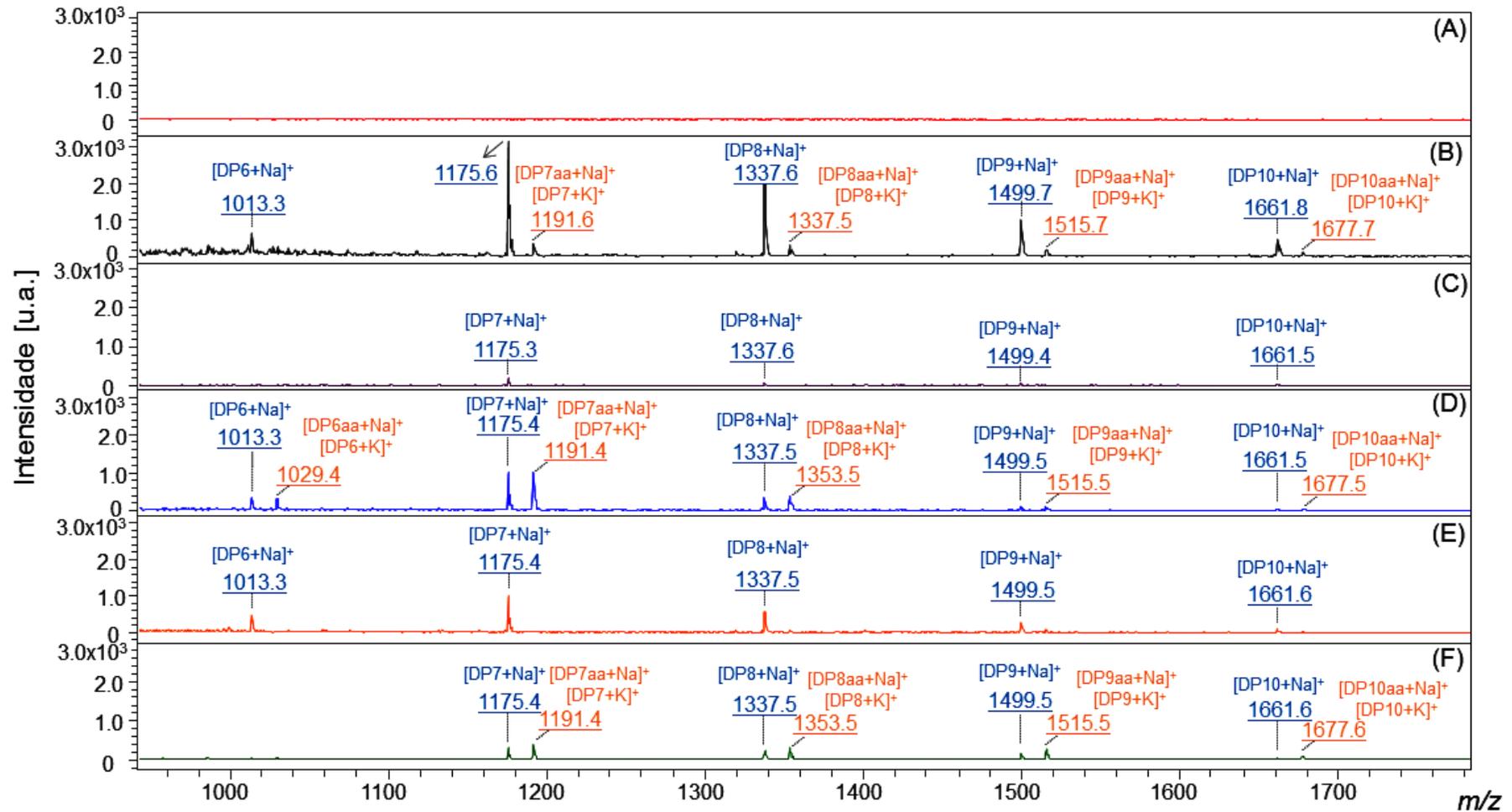


Figura 19: Espectros de massas por MALDI(+)-TOF MS do substrato PASC nos diferentes tampões e em água. No primeiro espectro, pode ser visualizada a matriz (A), que é utilizada como branco da análise. Nos demais espectros foram observados o perfil do substrato PASC quando incubado em água (B) e nos tampões de: acetato de amônio (C), fosfato de potássio (D), fosfato de sódio (E) e fosfato-salino (F). Valores de m/z destacados em azul se referem aos oligossacarídeos nativos, com adutos de sódio $[DP+Na]^+$, e os laranjas se referem a possíveis oligossacarídeos oxidados, na forma de ácido aldônico ou ainda a adutos de potássio de oligossacarídeos nativos $[DPaa + Na]^+$ ou $[DP + K]^+$.

Ao utilizar o tampão de fosfato de potássio (Figura 19D) e fosfato-salino (Figura 19F) foram visualizados valores de m/z referente a oligossacarídeos nativos com aduto de potássio ou a oligossacarídeos oxidados com aduto de sódio (mostrados em laranja na Figura 19). Esses valores apresentaram alta intensidade, em todos os experimentos e em todos os tempos de análise. Esses íons também foram detectados quando se utilizou a água (Figura 19B), porém em menor intensidade. Devido ao fato desse produto estar presente desde o tempo zero e nos controles, indica que se refere a um oligossacarídeo nativo que foi detectado como aduto de potássio, e não ao oligossacarídeo oxidado (produto da reação da LPMO), que por sua vez possuem mesmo valor de m/z (como já demonstrado anteriormente para o cluster DP6, na Figura 17).

Mesmo adicionando cloreto de sódio, que conforme visto anteriormente reduz a intensidade desses íons de “dupla interpretação”, o fato de esses tampões conterem potássio em sua composição favoreceu a alta intensidade desses íons. Dessa forma, tendo em vista a possibilidade de utilização de outros tampões nessas análises, sugere a inviabilidade de tampões contendo íons de potássio para esses tipos de análises. Ao utilizar o tampão de acetato de amônio (Figura 19C) e de fosfato de sódio (Figura 19E) foram visualizados apenas íons referentes a oligossacarídeos nativos como aduto de sódio. O mesmo foi verificado em todos os tempos reacionais e também nos controles, mostrando que a enzima não realizou clivagem oxidativa da celulose nessas condições. Apesar disso, por não apresentarem os íons de dupla interpretação esses tampões podem ser empregados nos ensaios de hidrólise de celulose por PASC.

Destaca-se ainda que a intensidade dos sinais referentes aos oligossacarídeos nativos foi maior quando se empregou o tampão de fosfato de sódio (Figura 19E). Além disso, esse tampão permitiu a detecção de mais oligossacarídeos (DP6 a DP10), quando comparado com o tampão de acetato de amônio (Figura 19C), que, por sua vez, não possibilitou a detecção do DP6.

Os melhores tampões de incubação (fosfato de sódio e acetato de amônio) foram então selecionados para realização do ensaio semelhante ao anterior, tendo a Avicel como substrato, como mostrado na Tabela 04. Para esses ensaios, duas concentrações de enzimas (a menor e maior concentração, 1 e 10 μM , respectivamente) e uma de ácido ascórbico (2 mM) foram escolhidas.

Tabela 4: Condições da reação enzimática com a TfAA10-O, produzida em *Erlenmeyer* e purificada por His-Tag, em Avicel.

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-O (1 μ M)	TfAA10-O (1 μ M)	-	-
	TfAA10-O (10 μ M)	TfAA10-O (10 μ M)	-	-
Substrato celulósico	Avicel (2 mg/mL)	Avicel (2 mg/mL)	Avicel (2 mg/mL)	Avicel (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão (5 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio	Acetato de amônio	Acetato de amônio	Acetato de amônio
	Fosfato de sódio	Fosfato de sódio	Fosfato de sódio	Fosfato de sódio

*Volume final de reação = 100 μ L, Agitação= 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 6, 24 e 48 h..

Como não houve diferença no perfil dos produtos da reação, quando se empregou 1 e 10 μ M de enzima, considerou-se a menor concentração para as discussões em relação aos tampões de incubação. Além disso, não houve diferença entre os controles reacionais 01, 02 e 03 (Tabela 04), e mostrou apenas o controle 02 (na ausência de enzima e presença de ácido ascórbico) para as discussões. Os produtos da reação enzimática de TfAA10-O nessas condições podem ser visualizados na figura abaixo.

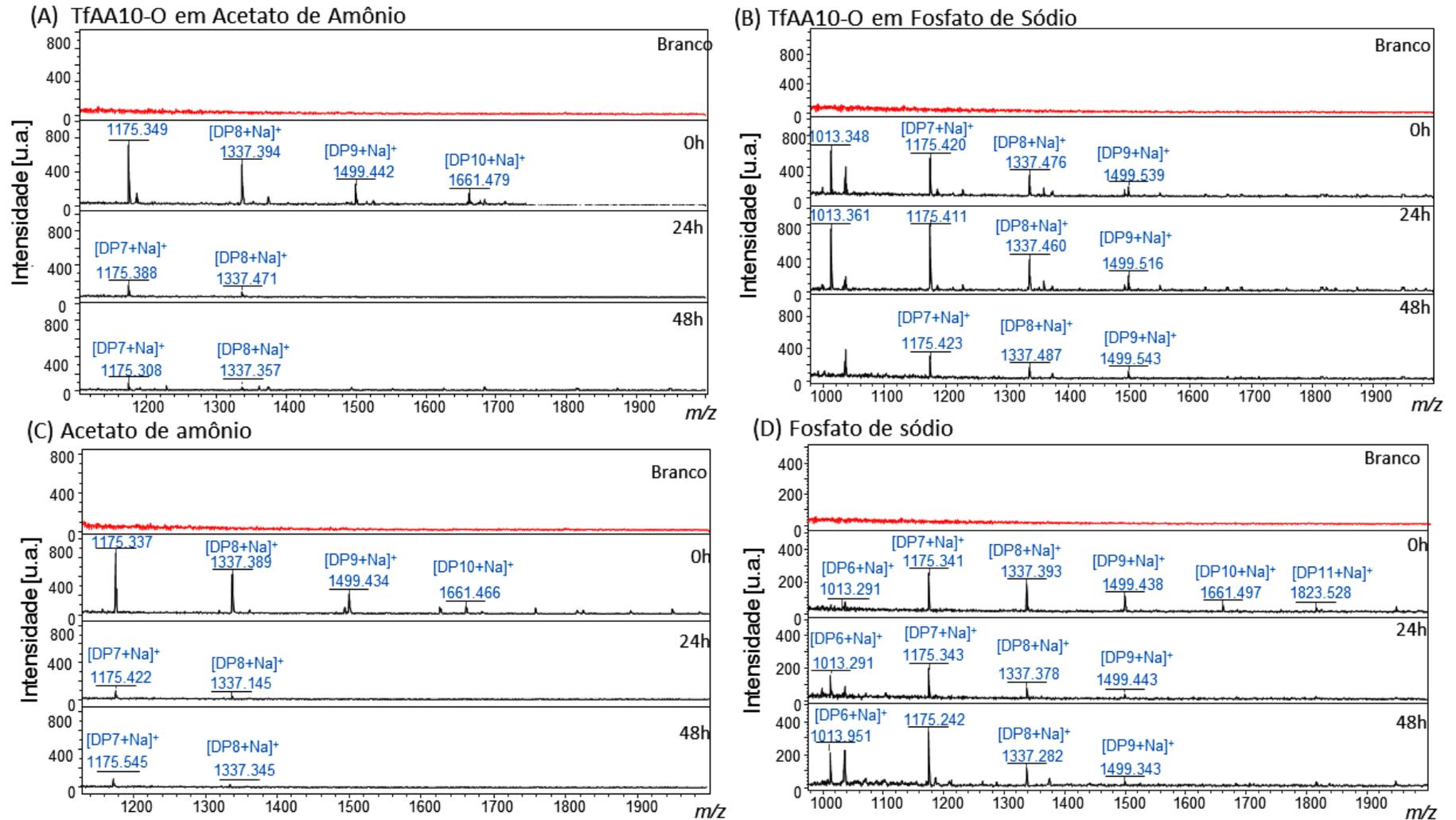


Figura 20: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da LPMO TfAA10-O 1 μ M em Avicel (2 mg/mL), na presença de ácido ascórbico (2 mM) em tampão de acetato de amônio (A) e fosfato de sódio (B) pH 6,0. Os controles da reação na ausência da enzima na presença nos tampões de acetato de amônio (C) e de fosfato de sódio (D) também são mostrados. Valores m/z em azul se referem a oligossacarídeos nativos com aduto de sódio [Dpn+Na]⁺. Em vermelho é mostrado o espectro da matriz, branco da análise.

Em relação aos tampões avaliados foi possível perceber que ao utilizar o tampão de fosfato de sódio (Figura 20B e D) mais oligossacarídeos foram detectados em comparação ao ensaio incubado em tampão de acetato de amônio (Figura 20A e C). No tempo inicial (0h) foi possível detectar o DP11 (m/z 1823) e ao longo dos tempos reacionais (24 e 48 h) o DP9 (m/z 1499) apenas quando se utilizou o tampão de fosfato de sódio.

Porém, o mesmo perfil visualizado nas amostras contendo enzimas (1 e 10 μ M) também foi visualizado nos controles em que a enzima estava ausente (Figura 20). Ou seja, apenas oligossacarídeos nativos foram visualizados ao longo do tempo reacional em todos os ensaios, na presença e ausência de enzima, sugerindo uma possível degradação da Avicel que por sua vez, não foi pela ação enzimática. Além disso, nenhum oligossacarídeo oxidado foi detectado, evidenciando que a enzima não apresentou clivagem oxidativa nas condições testadas.

Tendo em vista que o método analítico se mostrou eficiente na detecção de oligossacarídeos, mas que nenhum oligossacarídeo oxidado foi detectado em nenhuma condição testada é possível inferir que a enzima não apresentou atividade em nenhuma condição testada. Portanto, experimentos outra construção gênica da TfAA10 (com códon nativo), denominada como TfAA10- N foram realizados, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato. Destaca-se que esse substrato foi escolhido para as análises posteriores em virtude da maior intensidade dos íons obtidos neste substrato (Figura 19, intensidade de $\sim 3,0 \times 10^3$), em comparação a Avicel (Figura 20) com intensidades de $\sim 4,0 \times 10^2$.

5.2.2 Análise dos produtos das reações da enzima TfAA10-N produzida em erlenmeyer por MALDI-TOF MS

Os produtos da reação entre a enzima LPMO TfAA10-N e o substrato PASC foram avaliados por MALDI-TOF MS alterando a forma de purificação das enzimas: por afinidade (His-Tag) ou por troca iônica (DEAE), conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em *Erlenmeyer* e purificada por His-Tag e por troca iônica (DEAE) em substrato PASC.

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-N His-Tag (1 μ M)	TfAA10-N His-Tag (1 μ M)	-	-
	TfAA10-N DEAE (1 μ M)	TfAA10-N DEAE (1 μ M)	-	-
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)			

*Volume final de reação = 100 μ L, Agitação= 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 24 e 48 h..

Mesmo que os resultados anteriores, com a TfAA10-O, tenham mostrado que o tampão de fosfato de sódio teve melhor performance se comparado ao tampão de acetato de amônio (Figura 19 e 20), este último foi utilizado neste ensaio com a enzima TfAA10-N. Manteve-se o tampão de acetato de amônio, e alterou-se apenas as formas de purificação da enzima (His-Tag e DEAE) a fim de verificar a atividade desta nova construção gênica, sem demais alterações nas condições reacionais.

Diversas formas de purificação podem ser empregadas para obtenção de LPMOs puras, dentre elas podem ser citadas a cromatografia de afinidade (His-Tag), cromatografia por troca iônica e cromatografia de exclusão molecular. A escolha desta etapa pode influenciar na atividade da enzima, tendo em vista que os reagentes utilizados durante a purificação podem mimetizar algum componente importante do sítio ativo da enzima.

O sítio ativo da LPMO está relacionado ao “braço de histidina” (HARRIS *et al.*, 2010; GUDMUNDSSON *et al.*, 2014; FORSBERG *et al.*, 2014; HEDEGARD e RYDE, 2017), sendo que uma das histidinas utilizadas nessa estrutura pode ser mimetizada pelo imidazol (empregado na eluição da cromatografia por afinidade, His-Tag) ou ainda pelos próprios resíduos da cauda de histina acarretando no bloqueio do sítio ativo e consequente inatividade enzimática. Dessa forma, foram escolhidas duas formas de purificação da enzima: por afinidade (His-Tag) que é uma purificação mais fácil e com maior especificidade.

O mesmo perfil foi visualizado ao longo dos tempos reacionais e em relação aos controles (na ausência de enzima e/ou ácido ascórbico). Para demonstração do perfil dos produtos da reação da TfAA10-N em PASC serão considerados os produtos da reação com a enzima purificada por troca iônica (Figura 21), tendo em vista que não houve diferença destes produtos em relação a enzima purificada por His-Tag.

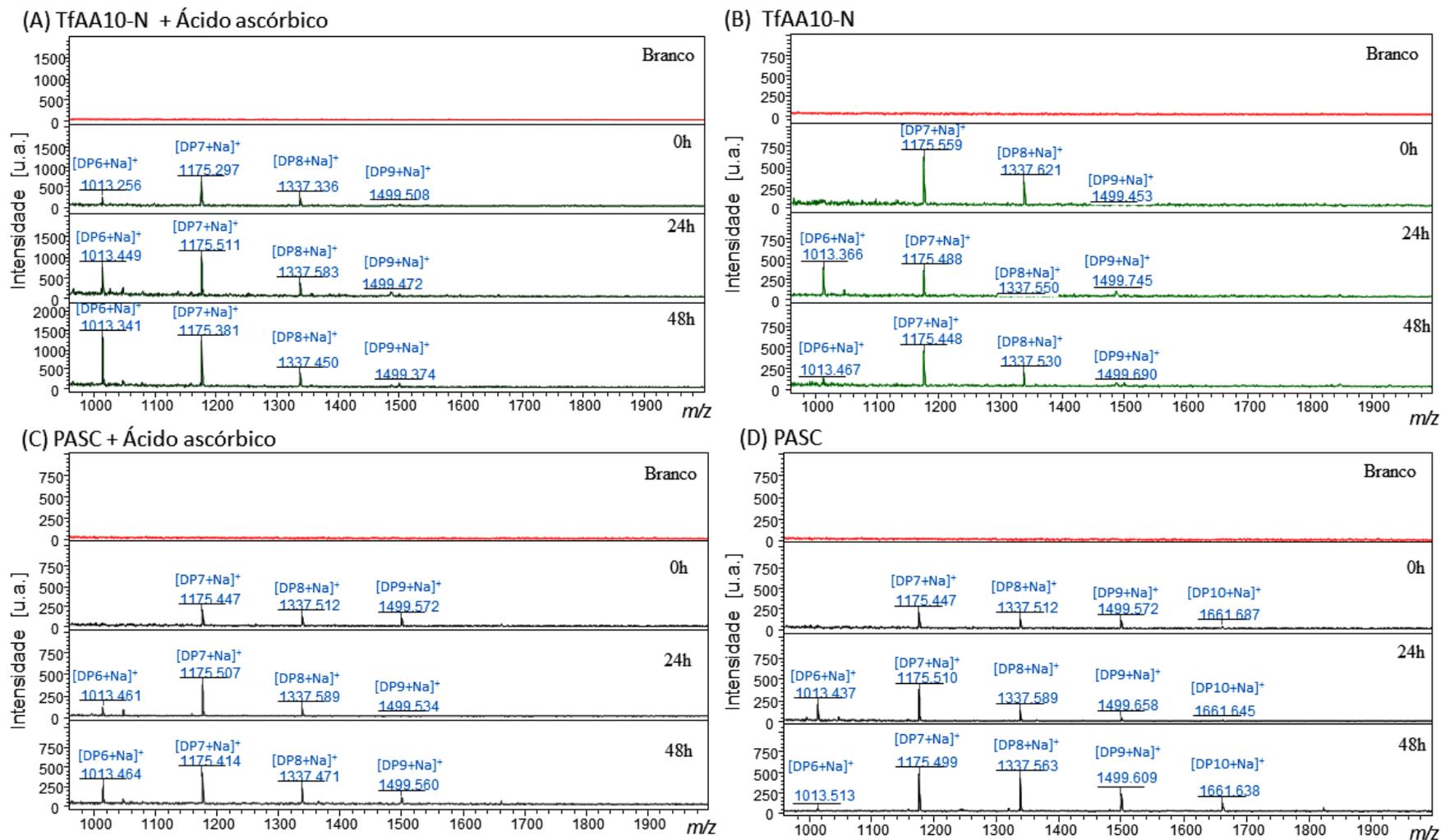


Figura 21: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da TfAA10-N, purificada por troca iônica (DEAE) em substrato do tipo PASC na presença (A) e ausência de ácido ascórbico (B) e com os respectivos controles na ausência da enzima, com (C) e sem (D) ácido ascórbico em tampão de acetato de amônio pH = 6,0. Em vermelho pode ser visualizado o espectro da matriz DHB, utilizado como branco da análise.

A visualização dos oligossacarídeos nativos com diferentes graus de polimerização (DP6 a DP9) foi possível em todos os ensaios e em tempos reacionais avaliados (0, 24 e 48 h). Já o íon referente ao DP10 (m/z 1661) foi detectado apenas no ensaio controle (na ausência de enzima e de ácido ascórbico, Figura 21D). Porém, em nenhuma das reações foi visualizado oligossacarídeos oxidados. Apesar disso, é importante destacar a baixa intensidade dos íons ($\sim 5 \times 10^2$) referentes aos oligossacarídeos nativos em todos os ensaios. Por isso, o método analítico foi novamente otimizado de modo a permitir maior intensidade dos íons de interesse.

5.2.2.1 Otimização da análise por MALDI-TOF MS

Para a otimização do método analítico por MALDI-TOF MS foram utilizadas duas amostras do ensaio anterior (Tabela 5): (i) PASC com ácido ascórbico após 48 h de reação (controle 02) e (ii) o produto da reação enzimática da TfAA10-N purificada por troca iônica em PASC após 48 h de reação, contendo ácido ascórbico (ensaio). Como não houve diferença entre as amostras analisadas foram representados os espectros de massas apenas do controle.

Inicialmente as amostras foram testadas quanto ao método de plaqueamento *two-layer* e *dried droplet*, ambas com adição de cloreto de sódio e utilizando matriz DHB (20 mg/mL), mas variando a proporção de amostra-matriz, de 1:1 até 1:3, aumentando a quantidade de matriz de 0,5 em 0,5. A Figura 22 contém espectros de cada forma de plaqueamento testado. Não houve diferença entre a utilização do método *two-layer* ou *dried-droplet*, somente quando se utilizou diferentes proporções de amostra-matriz.

Dessa forma, para os testes posteriores, optou-se por utilizar o método *dried-droplet*, tendo em vista a questão econômica, já que este método faz uso de uma menor quantidade de matriz se comparado com o outro método.

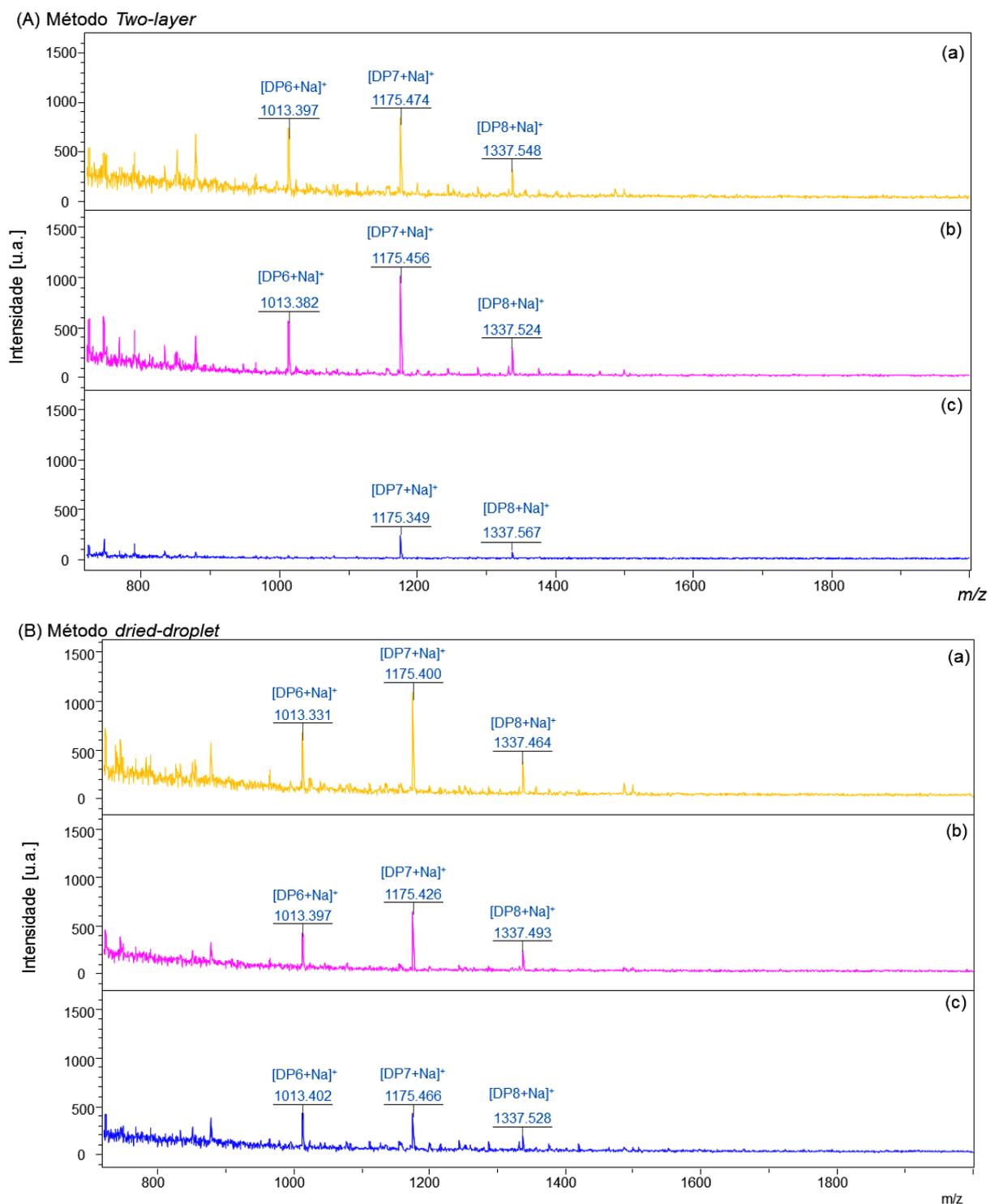


Figura 22: MALDI(+)-MS das amostras de PASC plaqueadas pelo método *two-layer* (A) e *dried-droplet* (B) em diferentes proporções de amostra-matriz:(a)1:2, (b)1:3 e (c) 1:5.

Nos resultados observou-se que quanto menor a quantidade de matriz na mistura entre amostra-matriz, maior foi a intensidade dos íons de interesse. Portanto, para confirmar essa

observação, testou-se uma concentração menor de matriz (20 mg/mL e 9 mg/mL –Figura 23), bem como outras proporções amostra-matriz (Figura 24).

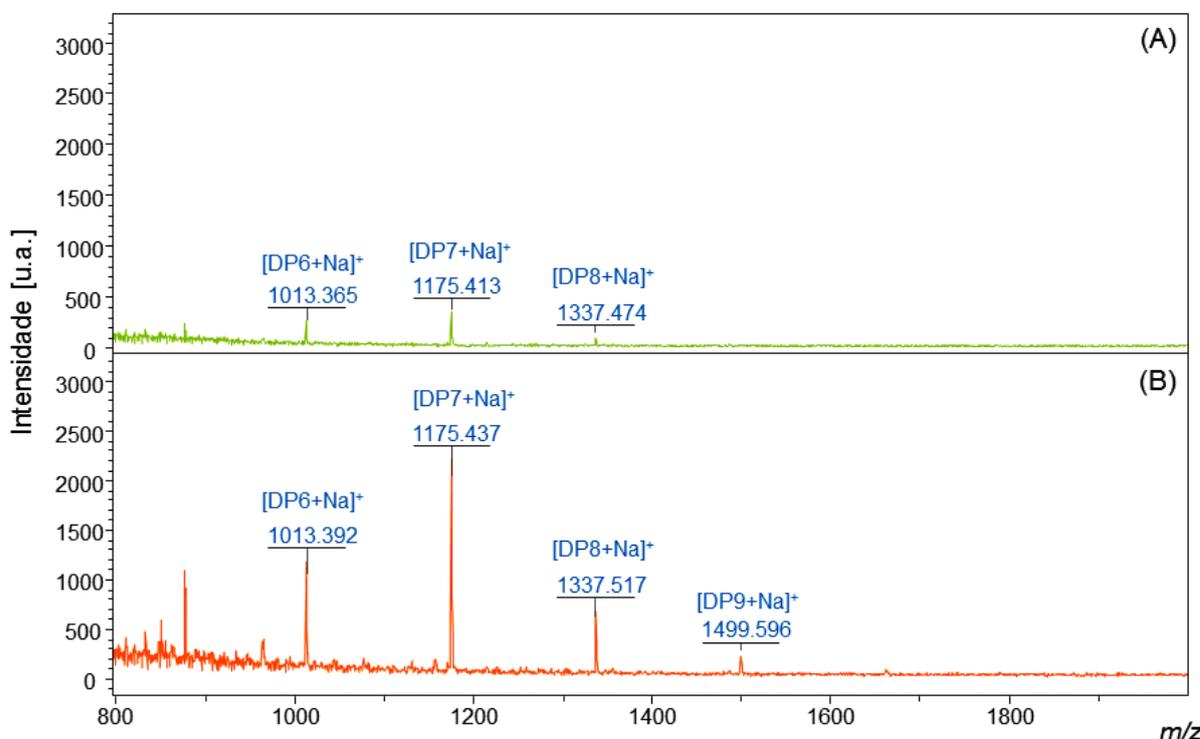


Figura 23: MALDI(+)-MS das amostras de PASC plaqueadas pelo método *dried-droplet* com matriz nas concentrações de 20 mg/mL (A) e 9 mg/mL (B).

Considerando o íon mais intenso nas análises (m/z 1175) note que a utilização da matriz de menor concentração proporcionou aumento de cinco vezes na intensidade desse íon (Figura 23). Dessa forma, essa concentração de matriz (9 mg/mL), bem como o método *dried-droplet* (previamente escolhido) seguiram para o próximo passo, a fim de identificar a melhor proporção entre amostra e matriz.

É importante destacar que a matriz na concentração de 9 mg/mL também foi testada como sendo solubilizada em solução com acetonitrila 30%, contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), que é o mesmo solvente da matriz na concentração de 20 mg/mL, utilizada anteriormente. Porém, não houve diferença entre o uso dessa solução, e por isso esta matriz foi solubilizada apenas em acetonitrila (30%), sem a adição de TFA 0,1%.

A fim de verificar a melhor proporção de amostra e matriz, manteve-se o método de plaqueamento *dried-droplet* com a matriz DHB (9 mg/mL) e adição de cloreto de sódio (2 mM) para cationizar os produtos de interesse e variou-se a proporção de matriz e amostra, conforme pode ser visualizado abaixo.

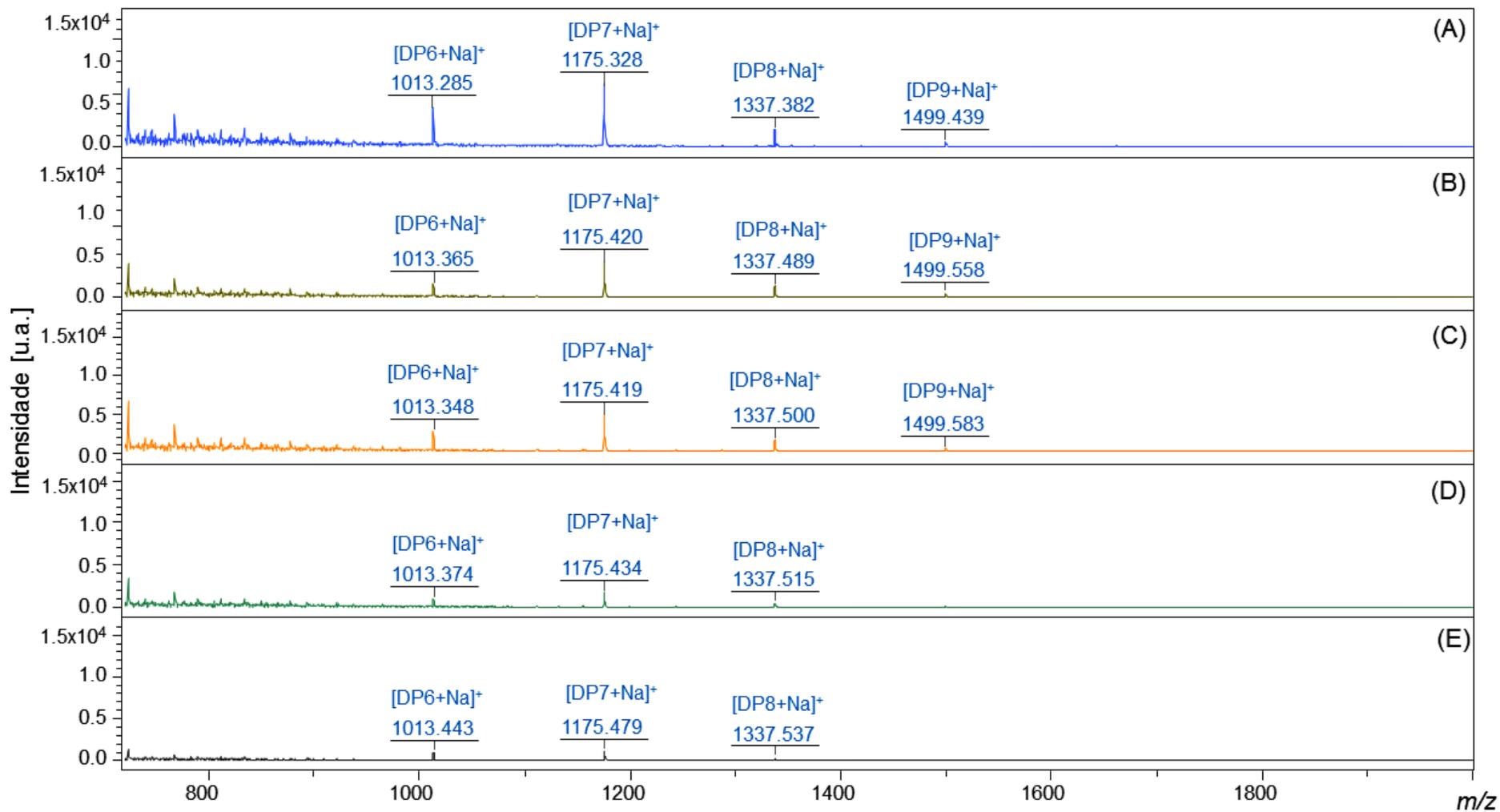


Figura 24: MALDI(+)-MS das amostras de PASC plaqueadas pelo método *dried-droplet*, utilizando o DHB (9 mg/mL) como matriz, com diferentes proporções amostra-matriz: 1:1 (A), 1:1,5 (B), 1:2 (C), 1:2,5 (D) e 1:3 (E) .

Os resultados também permitiram a observação de que quanto maior foi a quantidade de matriz aplicada na mistura de amostra-matriz, menor foi a intensidade dos íons de interesse. Mesmo não tendo uma diferença expressiva na intensidade dos íons ao utilizar as proporções de 1:1, 1:1,5 e 1:2 (Figura 24A, B e C), será considerada a proporção de 1:1 tendo em vista a questão econômica.

A influência do cloreto de sódio foi avaliada novamente e mostrou-se importante para as análises como descrito anteriormente. Assim, os testes realizados permitiram a definição de um protocolo de preparo de amostras que possibilita maior intensidade dos íons de interesse. A figura abaixo mostra um fluxograma detalhado das etapas que foram seguidas até a obtenção desse método.

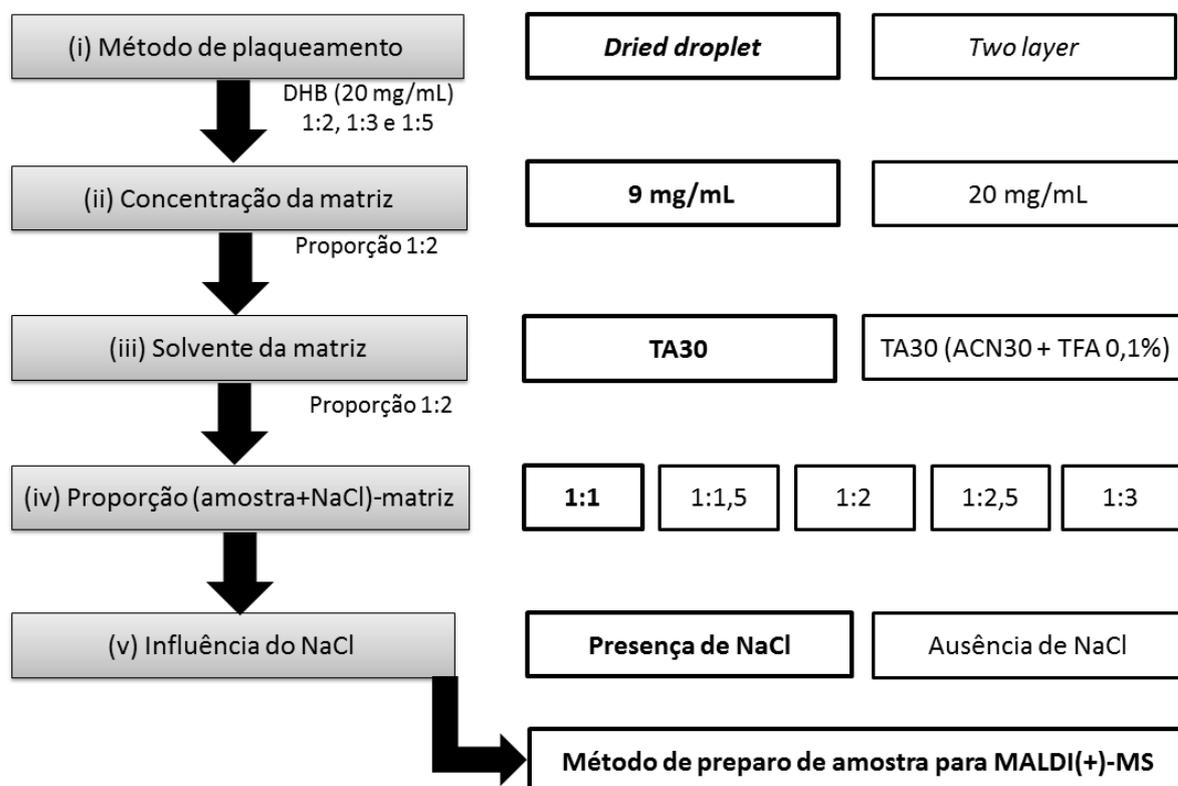


Figura 25: Etapas para otimização do preparo de amostras para análise por MALDI-TOF MS. Em negrito são mostrados os melhores parâmetros e que foram considerados para a análise do próximo parâmetro até a obtenção do melhor método.

É importante destacar que os parâmetros instrumentais foram novamente ajustados para garantir a maior intensidade dos íons de interesse. Dessa forma o novo método análise para análises de oligossacarídeos por MALDI-TOF MS consiste na aplicação da amostra pelo método *dried-droplet* na proporção de 1:1 com a matriz DHB (9 mg/mL), contendo cloreto de sódio (2,5 mM). Sendo que os dados de massas são adquiridos com o laser no modo *ultra*

com intensidade 10-30%, 1000 *shots*, frequência de 2000, ganho de detector de 5,0x e modo defletor.

Na Figura 26 é possível visualizar a melhoria da intensidade dos sinais no método anterior (A) para o novo (B), que garante maior intensidade dos íons além da detecção de um maior número de oligossacarídeos.

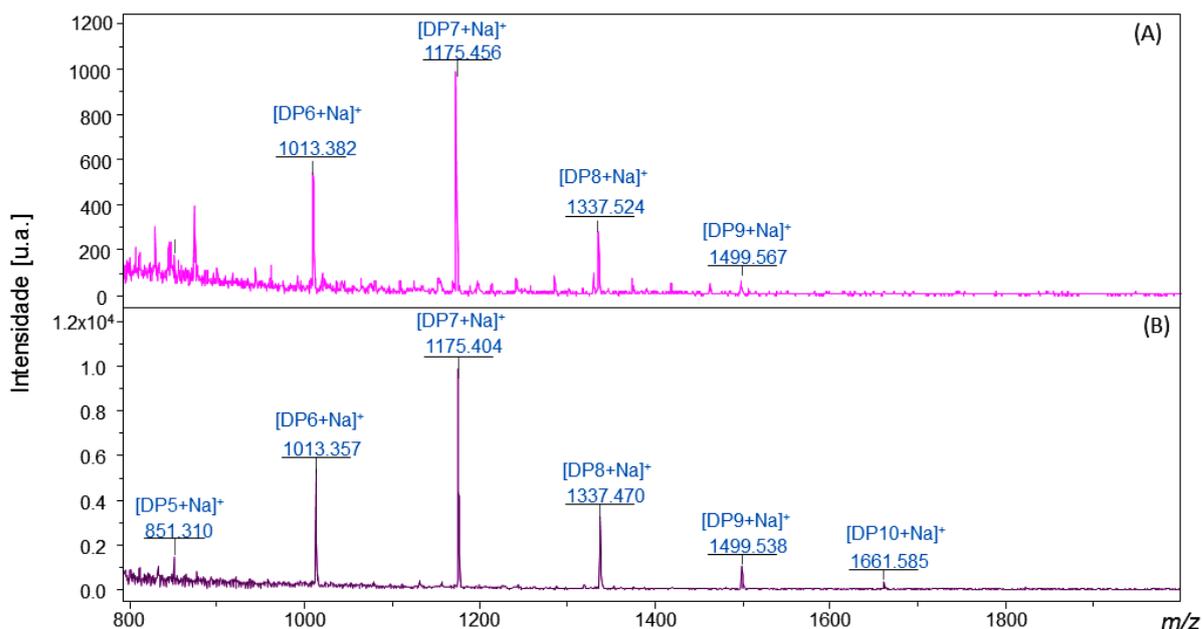


Figura 26: MALDI(+)-MS da amostra (PASC após 48 h de incubação a 50° C e 1400 rpm) analisada pelo método antes (A) e após (B) a otimização do método analítico.

Ressalta-se que os produtos das reações anteriores foram reanalisados por esse método, porém apresentaram o mesmo perfil visto anteriormente. Ou seja, nenhum oligossacarídeo oxidado foi visualizado e não houve diferença do perfil dos oligossacarídeos ao longo do tempo de reação e em relação aos controles.

Para tanto, foi necessário realizar novos ensaios com as enzimas e substratos. É visto na literatura que a adição de Cu^{2+} auxilia na atividade enzimática das LPMOs (MARINAI, 2013; LOOSE *et al.*, 2014; LOOSE *et al.*, 2016; VALENZUELA *et al.*, 2017), portanto, ensaios foram realizados com a enzima TfAA10-N com Cu^{2+} .

5.2.2.2 Análise do produto da reação da TfAA10-N saturada com Cu^{2+}

Ensaio com a LPMO TfAA10-N, purificada por troca iônica e saturada com Cu^{2+} , em PASC, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em *Erlenmeyer* e purificada por His-Tag seguida da saturação com Cu^{2+} .

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-N His-Tag (1 μM)	TfAA10-N His-Tag (1 μM)	-	-
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão	Acetato de amônio (10 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)

*Volume final de reação = 100 μL , Agitação= 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 24 e 48 h..

Os produtos da reação enzimática foram realizados analisados com o método de MALDI-TOF MS otimizado. Os produtos da reação enzimática nessas condições podem ser visualizados na Figura 27

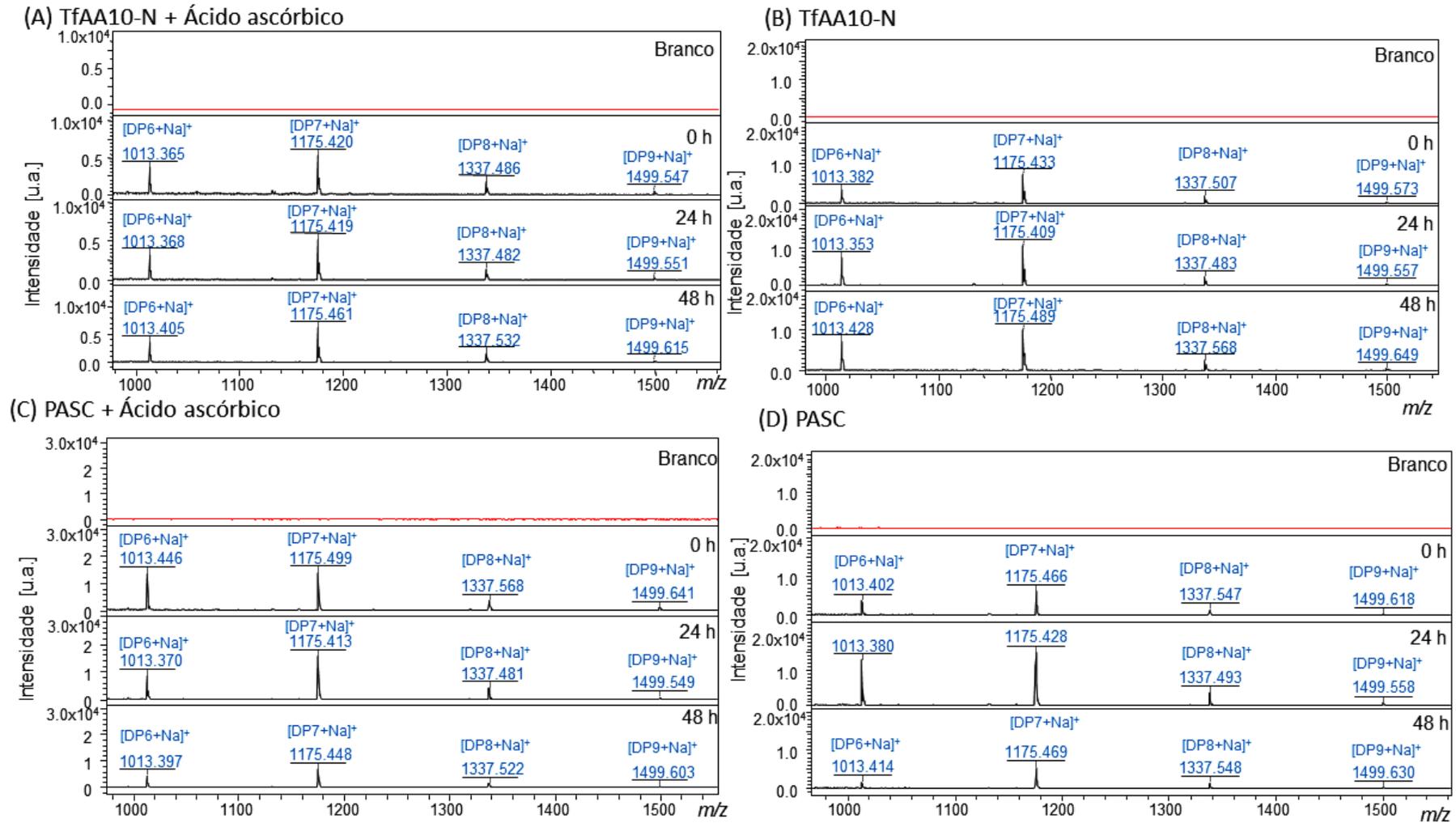


Figura 27: MALDI(+)-MS dos produtos da reação entre TfAA10 purificada por troca iônica e saturada com cobre em substrato PASC (2 mg/mL) na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência de ácido ascórbico (D). Cada grupo de espectros apresenta primeiramente o branco, contendo a matriz DHB (em vermelho). Os oligossacarídeos (DPn) nativos são mostrados em azul na forma de aduto de sódio $[DPn+Na]^+$. DPn se refere ao grau de polimerização, nesse caso por ser um celo-oligossacarídeo, n refere-se ao número de glicoses que compõe o polímero.

Não houve diferença no perfil dos produtos da reação enzimática (Figura 27A) ao longo do tempo reacional (0, 24 e 48 h) e em relação aos controles (Figura 27 B, C e D). Em todos os ensaios e também ao longo dos tempos avaliados foram detectados oligossacarídeos nativos com aduto de sódio $[DP_n+Na]^+$, sendo eles: DP6, DP7, DP8 e DP9 correspondentes aos valores m/z 1013, 1175, 1337 e 1499, respectivamente.

Porém, ao focar nos íons referentes ao cluster do heptâmero (DP7) foi possível verificar a presença de um íon referente a um possível oligossacarídeo oxidado $[DP7aa+Na]^+$, m/z 1191, nos tempos 24h e 48h, e principalmente naqueles contendo ácido ascórbico (Figura 28). Isso sugere que a presença desse possível produto oxidado seja devido à ação química do ácido ascórbico, e não pela ação enzimática da LPMO. O íon referente a perda de uma molécula água (-18 Da) em relação ao DP7 sodiado também foi detectado (m/z 1157) – $[DP7-H_2O+Na]^+$. Essas perdas neutras são comuns em análises pela técnica de espectrometria de massas.

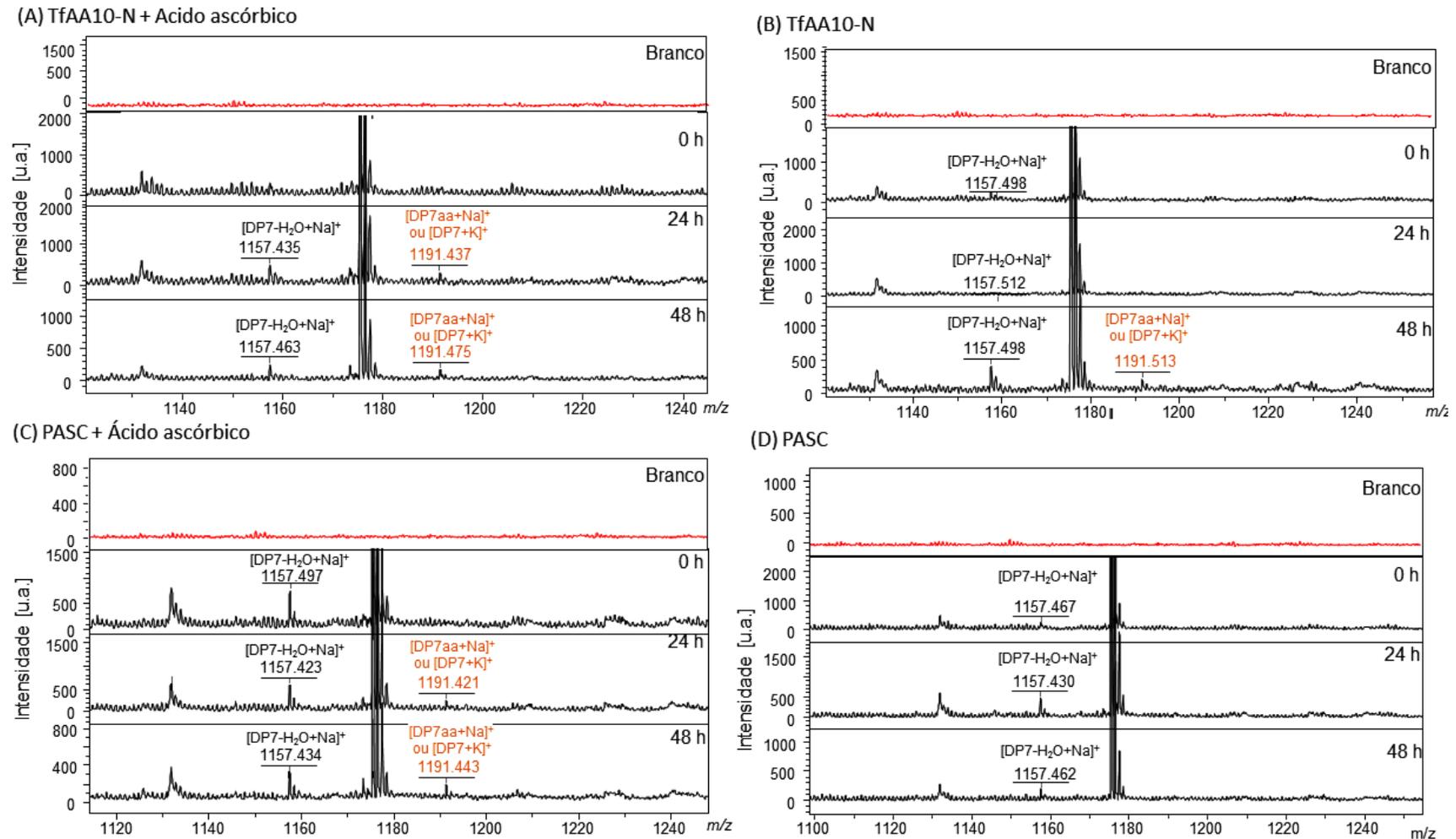


Figura 28: MALDI(+)-MS dos cluster do heptâmero (DP7) proveniente da reação entre TfAA10-N purificada por troca iônica e saturada com cobre em substrato PASC (2 mg/mL) na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência do doador de elétrons (D). Cada grupo de espectros apresenta primeiramente o branco, contendo a matriz DHB (em vermelho). Os íons com dupla interpretação – oligossacarídeos oxidado [DP7aa+Na]⁺ ou nativo [DP7+K]⁺ estão indicados em laranja. Também são observados íons referentes ao oligossacarídeo com perda de uma molécula de água [DP7-H₂O+Na]⁺.

As LPMOs podem apresentar atividade em polissacarídeos como celulose, e também em oligossacarídeos (FORSBERG *et al.* 2011). Dessa forma, a ação da LPMO TfAA10-N, purificada por troca iônica e saturada com Cu^{2+} , também foi avaliada utilizando a celohexaose (DP6) como substrato, conforme mostrado na Tabela 7.

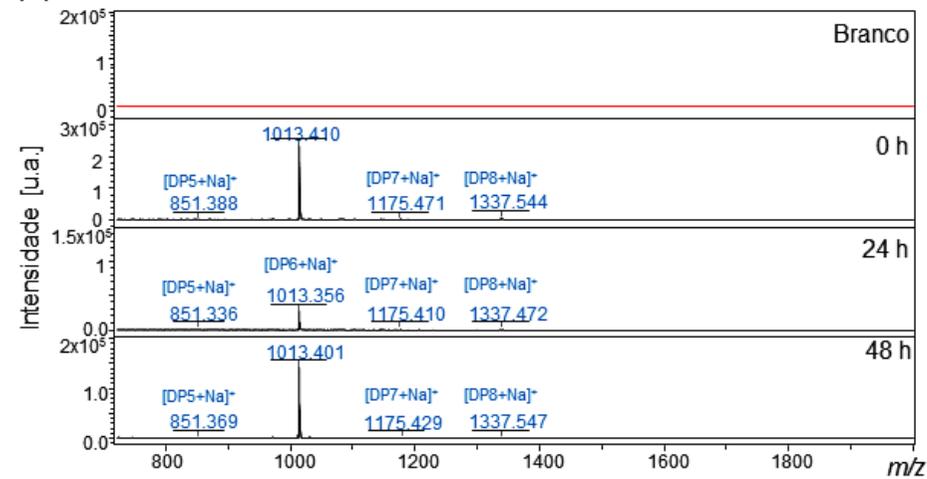
Tabela 7: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em *Erlenmeyer* e purificada por His-Tag seguida da saturação com Cu^{2+} .

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-N His-Tag (1 μM)	TfAA10-N His-Tag (1 μM)	-	-
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão	Acetato de amônio (10 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)

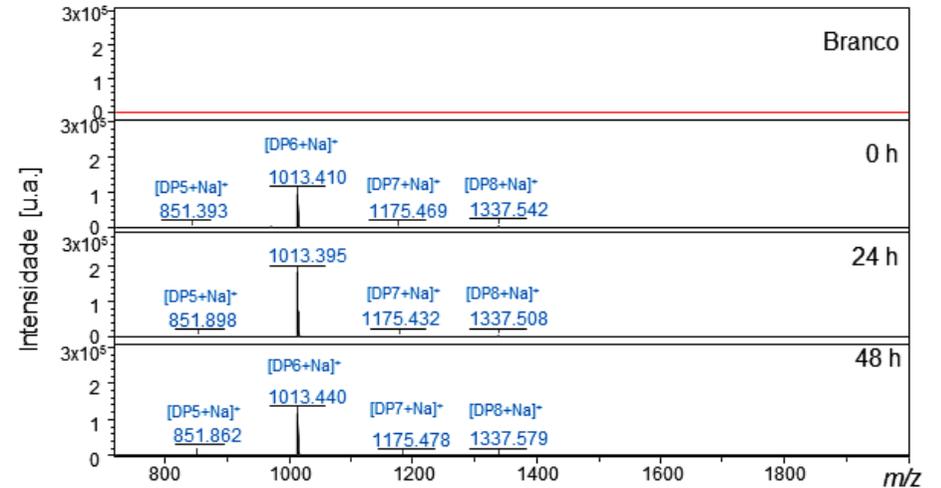
*Volume final de reação = 100 μL , Agitação = 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 24 e 48 h..

O perfil dos produtos da reação enzimática nestas condições é mostrado na Figura 29.

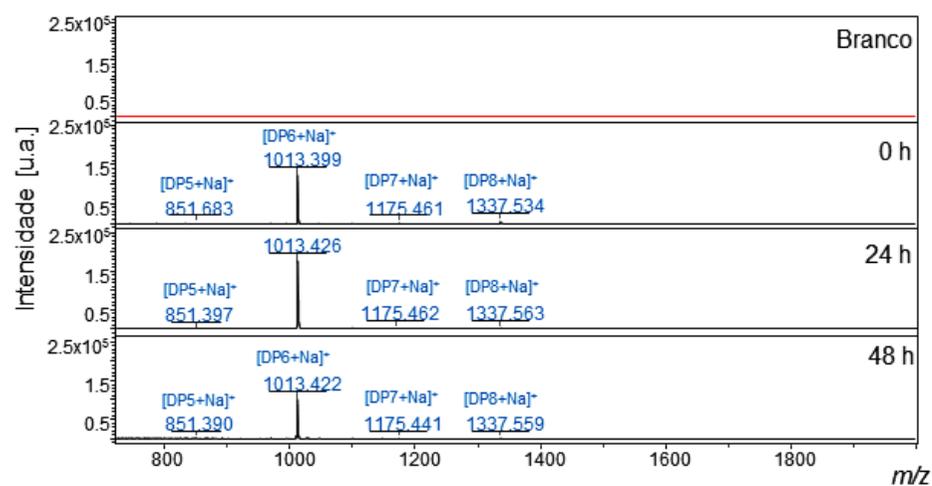
(A) TfAA10-N + Ácido ascórbico



(B) TfAA10-N



(C) DP6 + Ácido ascórbico



(D) DP6

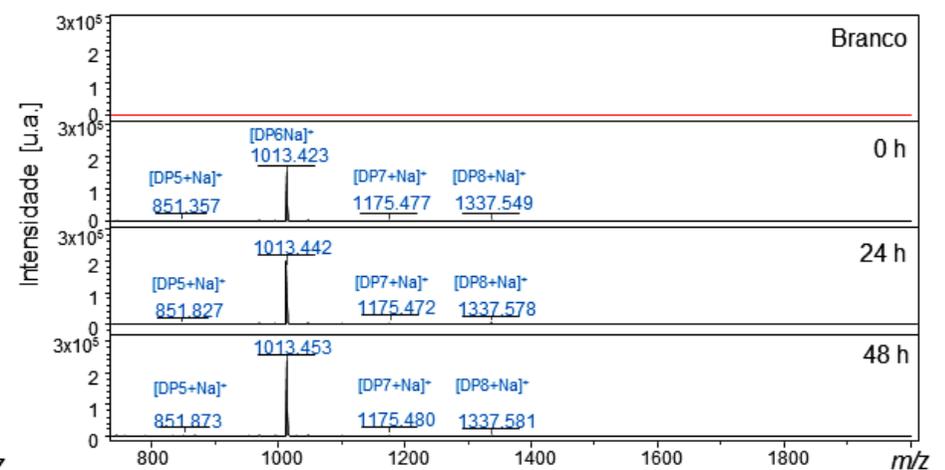


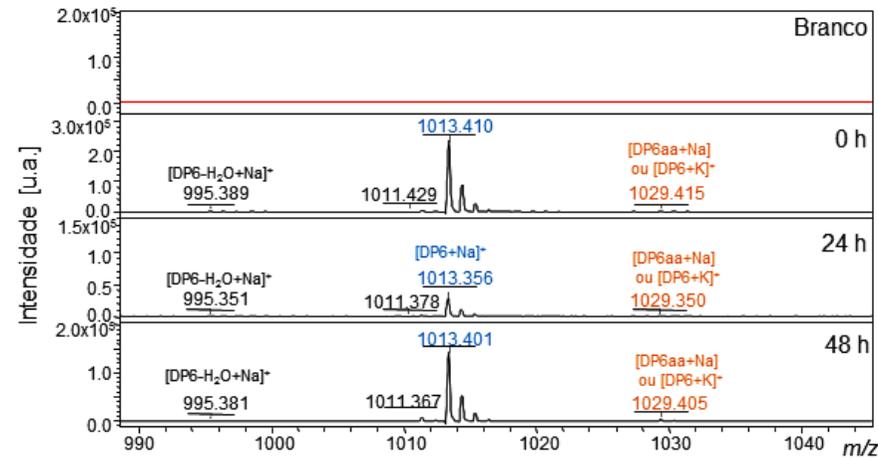
Figura 29: MALDI(+)-MS na faixa m/z 720-2000 dos produtos da reação entre TfAA10 purificada por troca iônica e saturada com cobre em substrato celohexaose (DP6) 0,5 mg/mL na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência do ácido ascórbico (D). Em vermelho é mostrado o espectro da matriz DHB, branco da análise. Os íons referente a oligossacarídeos nativos com aduto de sódio [DP6+Na]⁺ estão indicados de azul.

Como observado na Figura 29, o padrão de celohexaose não possui alto grau de pureza devido a presença de compostos de grau de polimerização superior a 6 (m/z 1175 e 1337 referente á DP7 e DP8 sodiados). Esses íons foram detectados em todos os ensaios e ao longo dos tempos reacionais (0, 24 e 48 h).

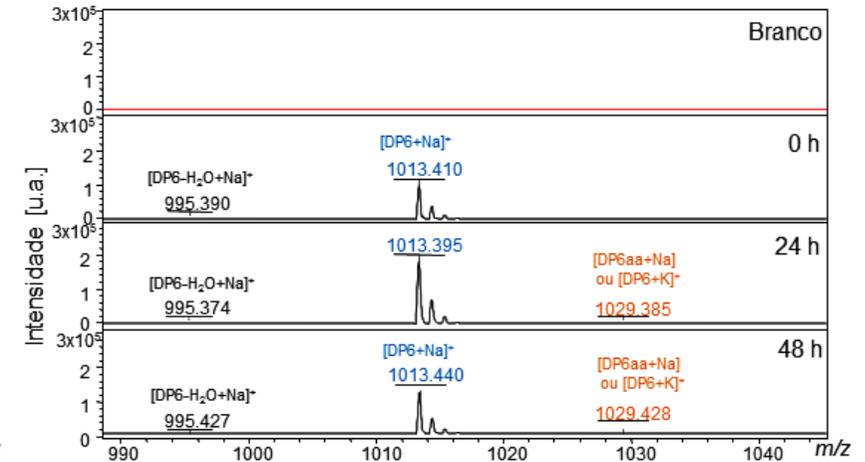
Já a presença de íons referente á DPs inferiores, como DP5 (m/z 851) demonstra a possível clivagem da molécula de DP6 (em todos os ensaios e em todos os tempos - Figura 29) em virtude da própria técnica empregada que faz uso de um laser e de compostos ácidos (matriz) que permitem a ionização dos analitos de interesse, ao mesmo tempo em que podem acarretar na clivagem destes. Por isso se faz necessário a análise de todos os controles para confirmar a ação enzimática.

Os produtos da reação do cluster do hexâmetro (DP6) foi melhor analisado ao focar na faixa de massa m/z 990-1045, como pode ser observado na Figura 30.

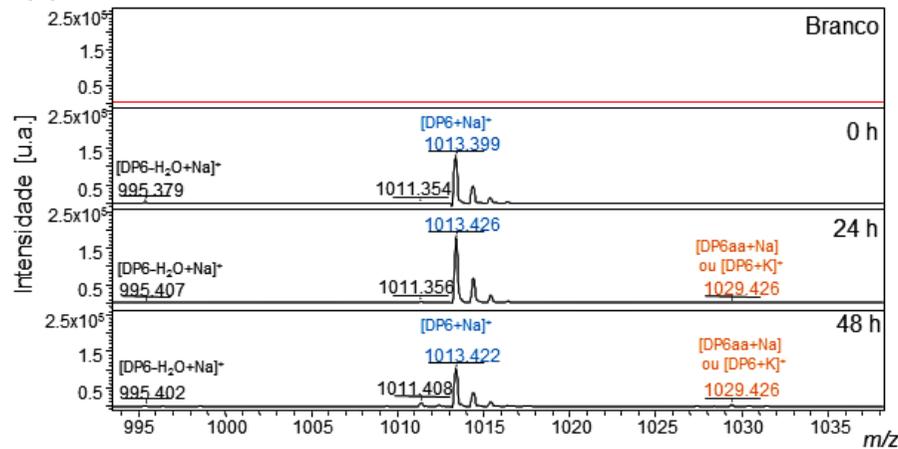
(A) TfAA10-N + Ácido ascórbico



(B) TfAA10-N



(C) PASC + Ácido ascórbico



(D) PASC

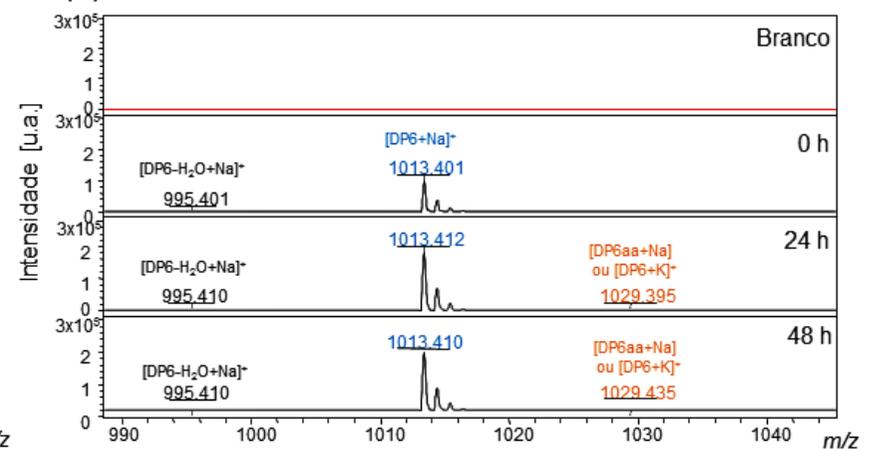
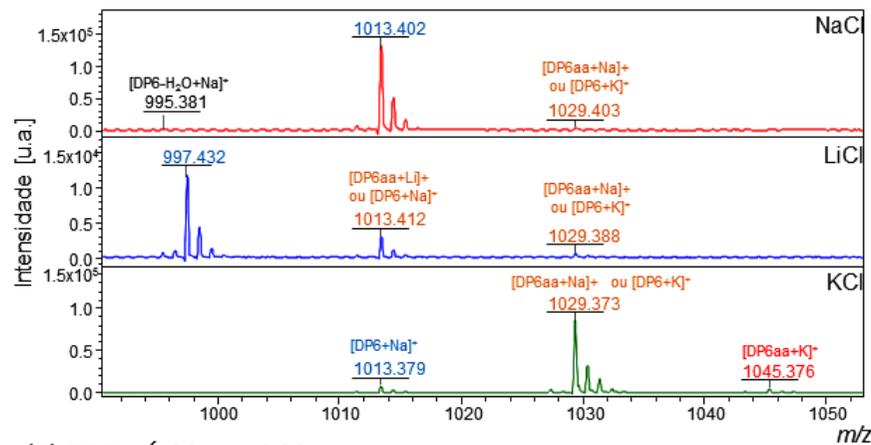


Figura 30: MALDI(+)-MS dos produtos da reação entre TfAA10 purificada por troca iônica e saturada com cobre em substrato celohexaose (DP6) 0,5 mg/mL na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência do ácido ascórbico (D). Em vermelho é mostrado o espectro da matriz DHB, branco da análise. Os íons referente a oligossacarídeos nativos com aduto de sódio [DP6+Na]⁺ estão indicados de azul, aqueles com dupla interpretação – [DP6aa+Na]⁺ ou [DP6+K]⁺ em laranja, e aqueles referente ao oligossacarídeo com perda de uma molécula de água (DP6-H₂O+Na)⁺ em preto.

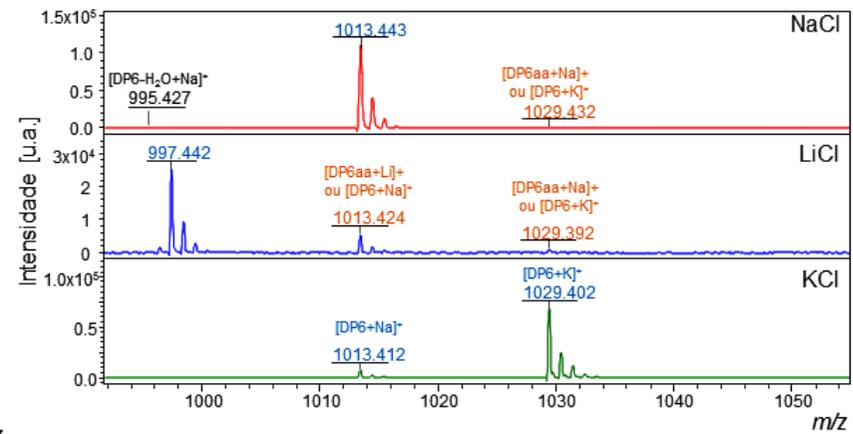
Ao analisar os produtos da reação enzimática da TfAA10-N na faixa de massa do cluster do hexâmetro (m/z 990-1045 – Figura 30) foi possível detectar o íon m/z 1029 que pode se referir tanto a um oligossacarídeo oxidado na forma de ácido aldônico com aduto de sódio $[DP6aa+Na]^+$ quanto a um oligossacarídeo nativo com aduto de potássio $[DP6+K]^+$.

A fim de verificar a real identidade desse íon, as amostras após 48h de cada reação foram dopadas com soluções salinas de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de lítio (LiCl) e cloreto de potássio (KCl), todas preparadas na concentração estoque de 10 mM, e aplicadas na concentração final de 2,5 mM, conforme o método *dried-droplet* descrito previamente. Os resultados são mostrados na Figura 31.

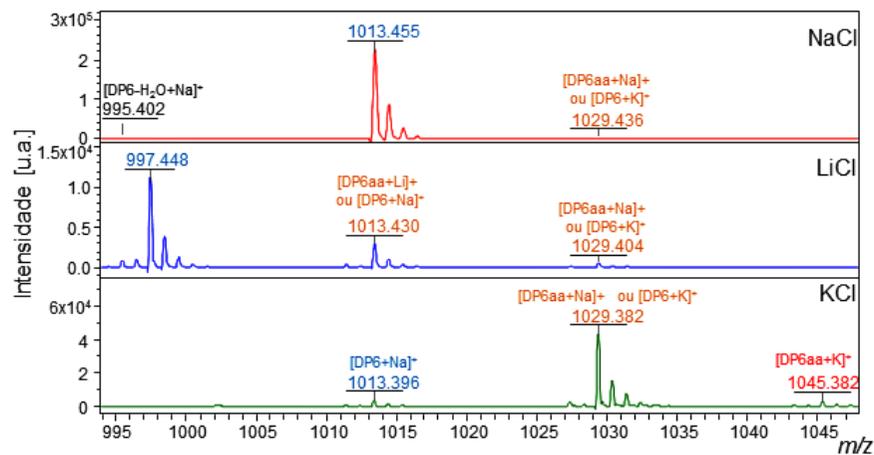
(A) TfAA10-N + Ácido ascórbico



(B) TfAA10-N



(C) DP6 + Ácido ascórbico



(D) DP6

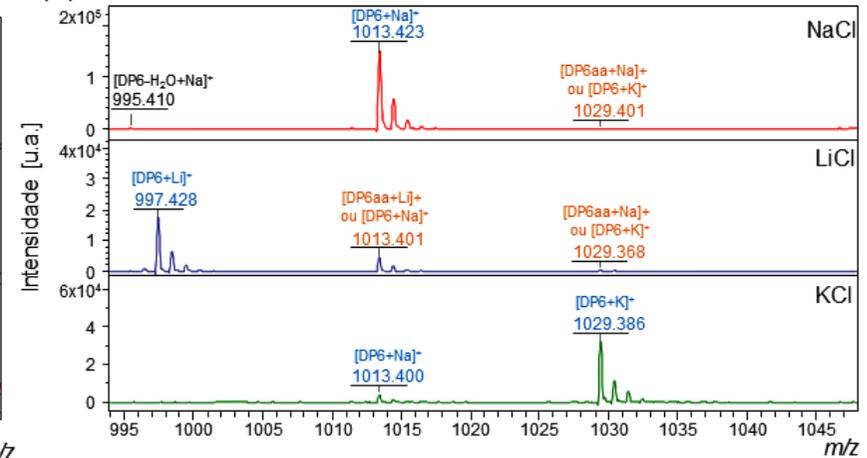


Figura 31: MALDI(+)-MS dos produtos entre TfAA10 saturada com cobre em substrato celohexaose (DP6) após 48h de reação. São mostrados produtos na presença (A) e ausência do ácido ascórbico (B), bem como na ausência da enzima na presença (C) e ausência de ácido ascórbico (D). Cada grupo de espectros apresenta os produtos após 48h de reação dopados com cloreto de sódio (NaCl, em vermelho), cloreto de lítio (LiCl, em azul) e com cloreto de potássio (KCl, em verde). Valores em azul indicam oligossacarídeos nativos, em vermelho oligossacarídeos oxidados e em laranja os íons dúbios (oligossacarídeos oxidados e/ou nativos).

Ao dopar as amostras com cloreto de sódio (Figura 31, em vermelho) é possível detectar íons referente a perda de água (m/z 995; $[\text{DP6-H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$), bem como a celohexaose sodiada (m/z 1013; $[\text{DP6}+\text{Na}]^+$) e o íon dúbio (m/z 1029; $[\text{DP6}+\text{K}]^+$ ou $[\text{DP6ox}+\text{Na}]^+$).

O *dopping* com cloreto de lítio (Figura 31 em azul) não fornece informações consistentes, tendo em vista que o íon m/z 997 se refere a celohexaose com aduto de lítio $[\text{DP6}+\text{Li}]^+$, enquanto o íon m/z 1013 pode se referir tanto a um oxidado com aduto de lítio $[\text{DP6ox}+\text{Li}]^+$ ou a um oligossacarídeo nativo com aduto de sódio $[\text{DP6}+\text{Na}]^+$. O íon m/z 1029 por sua vez pode indicar íons com a mesma dualidade de interpretação, isso porque adutos de lítio não são predominantes nesse tipo de ionização por MALDI-TOF MS.

Já o *dopping* com cloreto de potássio (Figura 31, em verde) fornece informações relevantes, tendo em vista que a detecção de um íon com 16 Da em relação ao m/z 1029, certamente se refere a um oligossacarídeo oxidado potassiado – m/z 1045 $[\text{DP6ox}+\text{K}]^+$, na forma de ácido aldônico (aa) ou gemdiol (gm). Esse íon foi visualizado nos ensaios contendo ácido ascórbico, na presença (Figura 31A) e ausência de enzima (Figura 31B). Isso sugere que os oligossacarídeos oxidados visualizados são provenientes da ação desse agente redutor.

Destaca-se que o *dopping* da amostra com diferentes sais permitiu definir a identidade dos íons duvidosos, sendo que os dados de cada sal foram complementares entre eles. Isso porque o íon duvidoso (m/z 1029) poderia ser apenas um oligossacarídeo nativo com aduto de potássio, caso a adição do sal de KCl aumentasse apenas a intensidade deste íon (Figura 29B e D). Porém, se a adição deste sal promovesse também a detecção de um íon com valor m/z com 16 Da a mais (1045), evidenciaria a presença de um oligossacarídeo oxidado detectado como aduto de potássio $[\text{DP6aa}+\text{K}]^+$ (Figura 31A e 31C).

Apesar disso, não foi possível verificar a clivagem oxidativa da enzima em PASC (Figura 27 e 28) e nem em DP6 (Figuras 29, 30 e 31). Os controles contendo ácido ascórbico nos ensaios com o substrato celohexaose (DP6) demonstraram que esse agente redutor foi capaz de produzir oligossacarídeos (intensidade de aproximadamente 1×10^4). Fato comprovado através do *dopping* com KCl que mostrou que os oligossacarídeos se referem a produtos oxidados.

Destaca-se que os oligossacarídeos oxidados são produtos esperados nas reações para confirmar a ação das LPMOs. Estes produtos deveriam ser detectados apenas nos ensaios na presença de enzima e de ácido ascórbico e no decorrer do tempo reacional (24 e 48 h), fato que não ocorreu. Apesar disso, é importante ressaltar a necessidade dos ensaios controles (com e sem enzima combinados com a presença e ausência de ácido ascórbico) para verificar

a ação das LPMOs, tendo em vista a possibilidade de oxidação do substrato na presença do doador de elétrons, mesmo que em baixa concentração.

O método analítico mostrou ser eficiente para detecção de oligossacarídeos, nativos e oxidados. Porém, não foi possível verificar a ação da LPMO nas condições testadas. A purificação a qual a enzima foi submetida (troca iônica e afinidade) poderiam ser as responsáveis pela enzima não apresentar atividade oxidativa. Dessa forma, foram realizados ensaios para o estudo da ação da TfAA10-N na forma de extrato bruto, ou seja, sem uma prévia purificação.

5.2.2.3 Análise do produto da reação do extrato bruto da TfAA10-N em PASC

Ensaio com o extrato bruto da TfAA10-N foram realizados em substrato celulósico do tipo PASC para análise da atividade da LPMO, sem uma etapa de purificação, nas condições reacionais apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Condições da reação enzimática com o extrato bruto da TfAA10-N, produzida em *Erlenmeyer* em PASC.

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-N (1 µM)	TfAA10-N (1 µM)	-	-
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão	Acetato de amônio (10 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)	Acetato de amônio (5 mM, pH = 6,0)

*Volume final de reação = 100 µL, Agitação= 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 24 e 48 h..

Os produtos da reação enzimática nestas condições foram analisados por MALDI-TOF MS e podem ser observados na Figura 32.

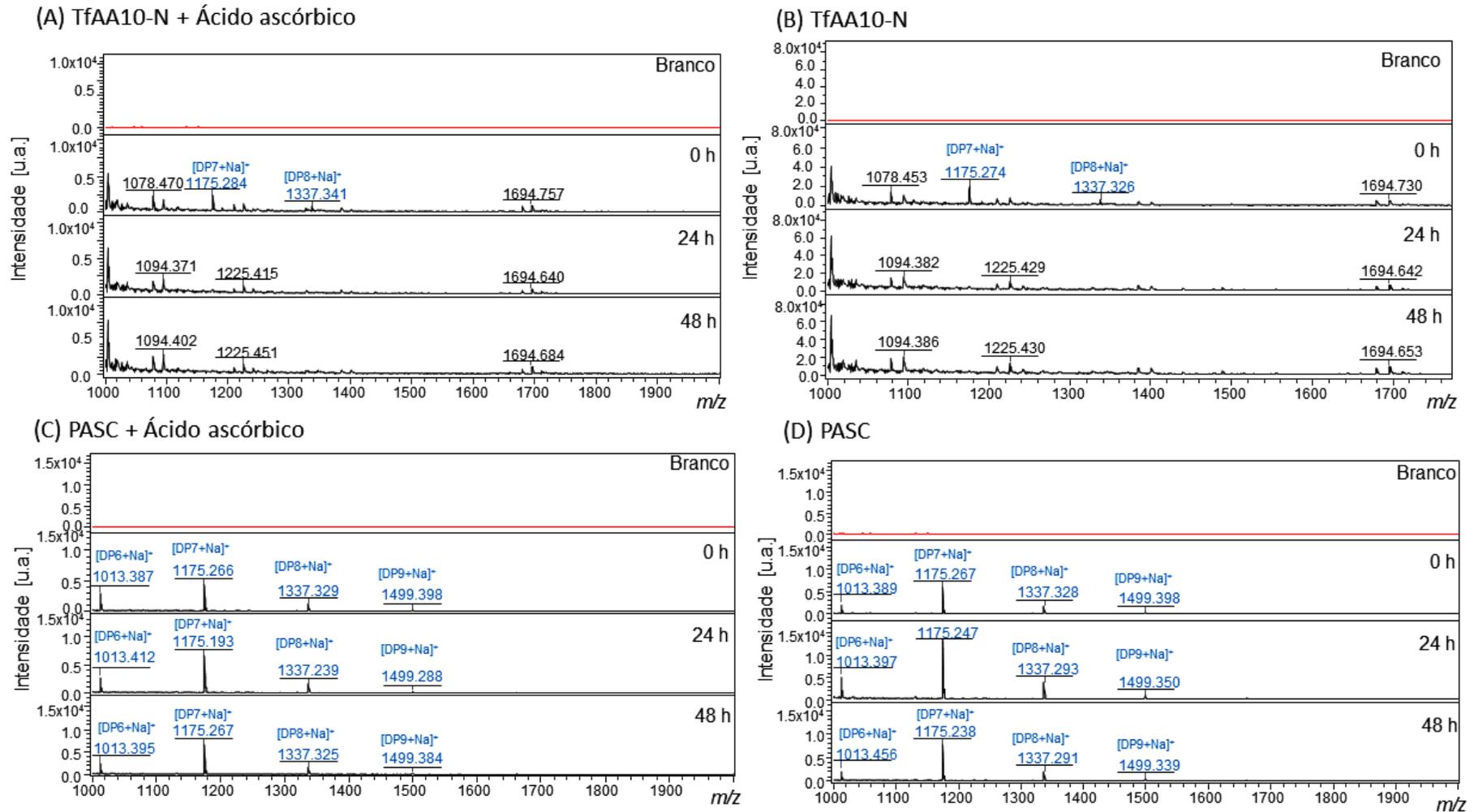


Figura 32: MALDI(+)-MS dos produtos da reação entre o extrato bruto de TfAA10 e o substrato PASC (A) na presença e (B) ausência do ácido ascórbico. Como controle da reação são mostrados o substrato PASC (C) na presença e (D) ausência do ácido ascórbico. Cada grupo de espectros (A-D) apresenta primeiramente o branco, contendo a matriz DHB (em vermelho), seguido dos produtos da reação ao longo dos tempos analisados (0, 24 e 48h). Em azul são mostrados os íons referente aos oligossacarídeos nativos com aduto de sódio [DP6+Na]⁺.

Ao analisar os produtos da reação do extrato bruto da TfAA10-N foi possível perceber que há diversos interferentes presentes no extrato bruto das enzimas (Figura 32A e B) que impossibilitam a detecção de oligossacarídeos. Pois nos controles em que o extrato bruto enzimático está ausente (Figuras 32C e D) os íons referentes aos oligossacarídeos nativos DP6, DP7, DP8 e DP9 são detectados em alta intensidade ($1,5 \times 10^4$ u.a). Isso pode estar ocorrendo em virtude do efeito de matriz e/ou supressão iônica, no qual as moléculas de interesse (oligossacarídeos) não estejam sendo detectadas em virtude do beneficiamento de outras moléculas.

Não houve detecção dos oligossacarídeos oxidados, produtos esperados da atividade de LPMOs, em nenhuma das condições analisadas mesmo após várias otimizações do método analítico por MALDI-TOF MS e também das condições reacionais. Uma das causas dessa não visualização pode ser o efeito de supressão iônica ou baixa taxa de degradação da enzima estudada, no qual os compostos oxidados provavelmente não estejam sendo detectados por uma questão de sensibilidade.

Dessa forma, a enzima TfAA10-N passou a ser produzida em biorreator, sob condições de cultivo controladas, a fim de permitir a obtenção de uma LPMO ativa. Isso porque a produção em biorreator permite o controle de condições de cultivo como pH e temperatura que são cruciais para que a enzima seja produzida na conformação correta (KITLL *et al.*, 2012) e conseqüentemente esteja ativa.

Também foi necessário o desenvolvimento de um método para análise dos produtos da reação da TfAA10 por LC-MS para reduzir o efeito de supressão iônica, garantindo maior sensibilidade para a técnica, mesmo em amostras mais complexas.

5.2.3 Desenvolvimento de método analítico por UHPLC-ESI-MS

Esse método foi desenvolvido conforme a metodologia de Boulos e Nystrom (2016), a fim de complementar os resultados obtidos nas análises por MALDI-TOF MS e assim auxiliar na interpretação dos dados sobre a atividade enzimática das LPMOs.

Destaca-se que este método permitirá a análise de amostras complexas com alta sensibilidade. Isso porque o emprego da cromatografia acoplada ao espectrômetro de massas reduz a supressão iônica através da prévia separação dos compostos. Além disso essa separação pode auxiliar a revelar a identidade de isômeros, que são tão comuns nos produtos dessas reações (formas oxidadas em C1 são isômeros das formas oxidadas em C4), por apresentarem tempos de retenção diferente.

O espectrômetro de massas empregado nesse método consiste em um ESI-Q-TOF MS que possui alta resolução, ou seja, foi capaz de determinar com precisão valores com até três casas decimais, permitindo obter fórmulas moleculares. Assim, esse método pode eliminar as eventuais dúvidas de que um íon se refere a um oligossacarídeo nativo com aduto de potássio (m/z 1029,291) ou se seria uma oligossacarídeo oxidado com aduto de sódio (m/z 1029,312). Vale destacar que mesmo que o *dopping* com diferentes sais na análise por MALDI-TOF MS possa revelar a identidade dos íons, uma análise adicional é de suma importância.

5.2.3.1 DIMS (*Direct Infusion Mass Spectrometry*)

Para o desenvolvimento de um método analítico baseado em LC-MS é necessário primeiramente realizar otimizações dos parâmetros analíticos do espectrômetro de massas (do inglês MS, *Mass Spectrometry*) e em seguida os ajustes do método cromatográfico adequado para as moléculas de interesse. Dessa forma, padrões de oligossacarídeos (ácido glucurônico, glicose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose) e substratos celulósicos (PASC e Avicel) foram utilizados para a otimização do método por DIMS (*Direct Infusion Mass Spectrometry*).

Nessa análise foi utilizada a seguinte ordem de injeção: (1) amostra, (2) calibrante de formiato de sódio 1 mM e (3) solvente acetonitrila:água 3:1 com hidróxido de amônio 0,1% como aditivo, utilizado como branco da análise. Dessa forma foi possível ajustar os parâmetros do MS, além de conhecer as diferentes formas dos íons em cada amostra (vide os espectros em Apêndice D).

Os substratos celulósicos não foram detectados em nenhuma das concentrações testadas. Mas todos os oligossacarídeos foram detectados, tanto nas análises em modo positivo, ESI(+)-MS, quanto negativo, ESI(-)-MS, no qual um dos padrões (celopentaose) foi utilizada como exemplo para demonstração do perfil obtido em cada modo de ionização (Figura 33).

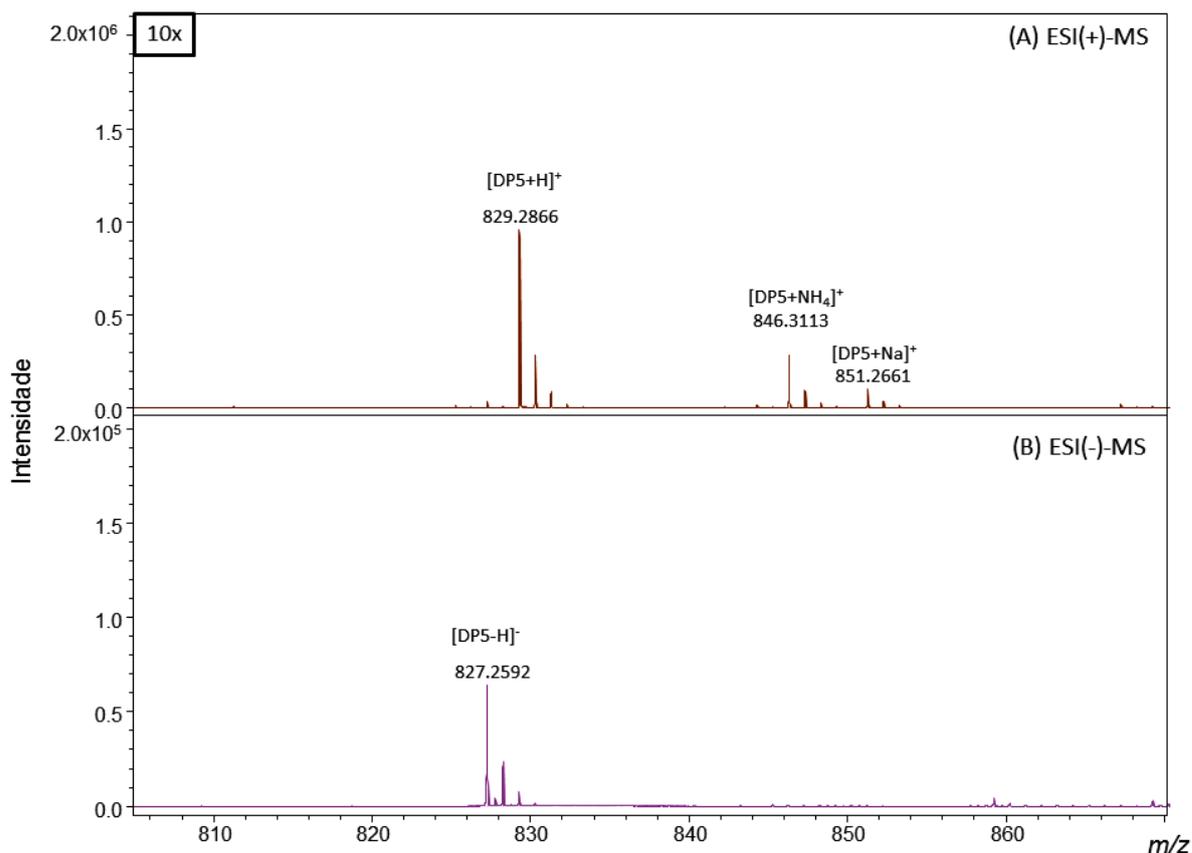


Figura 33: (A) ESI(+)-MS e (B) ESI(-)-MS de um padrão de oligossacarídeo (celopentaose - DP5).

Notou-se que as análises por ESI(+)-MS permitiram maior intensidade dos íons se comparado com as análises por ESI(-)-MS, sendo esta dez vezes maior. Assim, o DIMS permitiu definir a melhor condição de ionização nos dois modos e verificar qual apresentou os melhores resultados.

5.2.3.2 UHPLC-ESI-MS dos padrões de oligossacarídeos e celulose

Após a otimização do método DIMS, foi realizado o desenvolvimento do método por UHPLC-MS, de modo a evitar problemas de supressão iônica, uma vez que as amostras são muito complexas quimicamente.

Os padrões de oligossacarídeos (ácido glucurônico, glicose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose), na concentração de 40 µg/mL foram analisados individualmente por UHPLC-ESI-MS. Os substratos celulósicos PASC e Avicel também foram analisados nas concentrações de 50, 100 e 500 µg/mL.

Os tempos de retenção e os valores m/z dos íons detectados na análise dos padrões e substratos por UHPLC-ESI-MS, nos dois modos de ionização, podem ser visualizados na Figura 34 e resumidamente na Tabela 9.

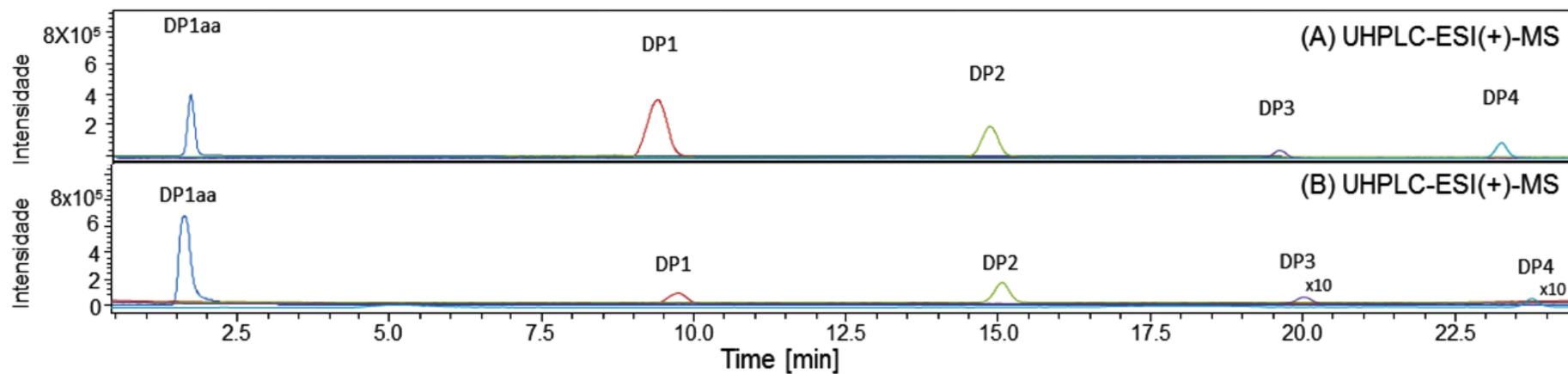


Figura 34: UHPLC-ESI-MS dos padrões de oligossacarídeos: ácido glucurônico (DP1aa), glicose (DP1), celbiose (DP2), celotriose (DP3) e celotetraose (DP4).

Tabela 9. Descrição dos íons encontrados no método analítico baseado em UHPLC-ESI-MS nos modos de ionização positivo e negativo.

Composto	Tempo de retenção (min)	Modo positivo		Modo negativo	
		Íons (<i>m/z</i>)	Descrição	Íons (<i>m/z</i>)	Descrição
Ácido glucurônico	2,3	217,032	[DP1aa + Na] ⁺	193,031	[DP1aa - H] ⁻
		239,008	[DP1aa + 2Na - H] ⁺	387,067	[2DP1aa - H] ⁻
		411,075	[2DP1aa + Na] ⁺		
Glicose	9,5	181,071	[DP1 + H] ⁺	179,004	[DP1 - H] ⁻
		203,053	[DP1 + Na] ⁺	359,147	[2DP1 - H] ⁻
Celobiose	15	343,124	[DP2 + H] ⁺	341,087	[DP2 - H] ⁻
		360,151	[DP2 + NH ₄] ⁺	683,184	[2DP2 - H] ⁻
		365,106	[DP2 + Na] ⁺		
		325,118	[DP2 + H - H ₂ O] ⁺		
		685,240	[2DP2 + H] ⁺		
		702,267	[2DP2 + NH ₄] ⁺		
Celotriose	20	487,171	[DP3 + H - H ₂ O] ⁺	503,126	[DP3 - H] ⁻
		505,177	[DP3 + H] ⁺	519,092	(Int. 10 ⁴)
		527,159	[DP3 + Na] ⁺		
Celotetraose	23,5	649,224	[DP4 + H - H ₂ O] ⁺	665,215	[DP4 - H] ⁻
		667,230	[DP4 + H] ⁺	647,172	[DP4 - H - H ₂ O] ⁻
		689,212	[DP4 + Na] ⁺		
Celopentaose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Celohexaose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PASC	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Avicel	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D.= Não detectado.

A partir dessa análise foi possível comparar os modos de ionização positivo e negativo (Figura 34 e Tabela 9) no qual o primeiro apresentou maior intensidade e diferentes formas (adutos) para o mesmo composto. Isso pode facilitar na identificação dos compostos durante as análises. Dessa forma, para as análises das amostras seguintes optou-se por utilizar o modo positivo, que na maioria dos padrões apresentou, no mínimo, a forma protonada [M+H]⁺ e dois adutos diferentes (em geral de sódio e de amônio), com intensidade superior a 1,0x10⁵).

Para os dados adquiridos por LC-MS serão mostrados os E.I.C. (*Extracted Ion Chromatogram*) de cada análise, os quais foram extraídos considerando os valores *m/z* referentes ao [M+H]⁺, [M+NH₄]⁺ e [M+Na]⁺ de cada possível forma a ser encontrada nas análises, conforme mostrado na Tabela 1.

Também foram testados tempos superiores a 20 min (30 e 50 min) na tentativa de detectar íons referentes ao DP5 e DP6, porém em nenhuma das condições de análise esses compostos foram detectados. De toda forma, para as análises dos produtos da reação manteve-se um tempo de 30 min, na expectativa de analisar oligossacarídeos com maior grau de polimerização.

O método analítico por MALDI-TOF MS, como verificado anteriormente, mostrou ser eficiente para a avaliação de oligossacarídeos com grau de polimerização igual ou superior a 5 (DP5), que não foram contemplados no atual método analítico por UHPLC-ESI-MS, que por sua vez, mostrou ser capaz de analisar oligossacarídeos com grau de polimerização menor ou igual a 4 (DP4). Isso evidencia a complementariedade das técnicas analíticas.

Dessa forma, foram realizadas análises do produto da reação enzimática por MALDI-TOF MS e UHPLC-ESI-MS concomitantemente para permitir uma avaliação minuciosa da ação da LPMO (TfAA10-N) produzida em biorreator, tendo em vista que aquelas produzidas em *Erlenmeyer* não apresentaram atividade nas condições testadas. Além disso, os produtos da reação foram avaliados até 72 h (ao invés de 48 h como nos ensaios anteriores) para permitir o estudo da atividade da LPMO, caso essa possua uma taxa de clivagem mais lenta.

5.2.4 Análise do produto da reação de LPMO, produzida em biorreator, por UHPLC-ESI-MS e MALDI-TOF MS

5.2.4.1 Análise do produto da reação da TfAA10-N em PASC e tampão de fosfato de sódio por UHPLC-ESI-MS e MALDI-TOF MS

Os ensaios com a LPMO TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, em substrato celulósico do tipo PASC com tampão de fosfato de sódio pH 6,0 foram realizadas conforme indicado na Tabela abaixo.

Tabela 10: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por His-Tag, em substratoPASC.

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-N (1 μ M)	TfAA10-N (1 μ M)	-	-
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão	Fosfato de sódio (10 mM, pH = 6,0)	Fosfato de sódio (10 mM, pH = 6,0)	Fosfato de sódio (10 mM, pH = 6,0)	Fosfato de sódio (10 mM, pH = 6,0)

*Volume final de reação = 100 μ L, Agitação= 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 24 e 72 h..

Os produtos da reação foram avaliados por UHPLC-ESI-MS (Figura 35) e MALDI-MS (Figuras 36 e 37).

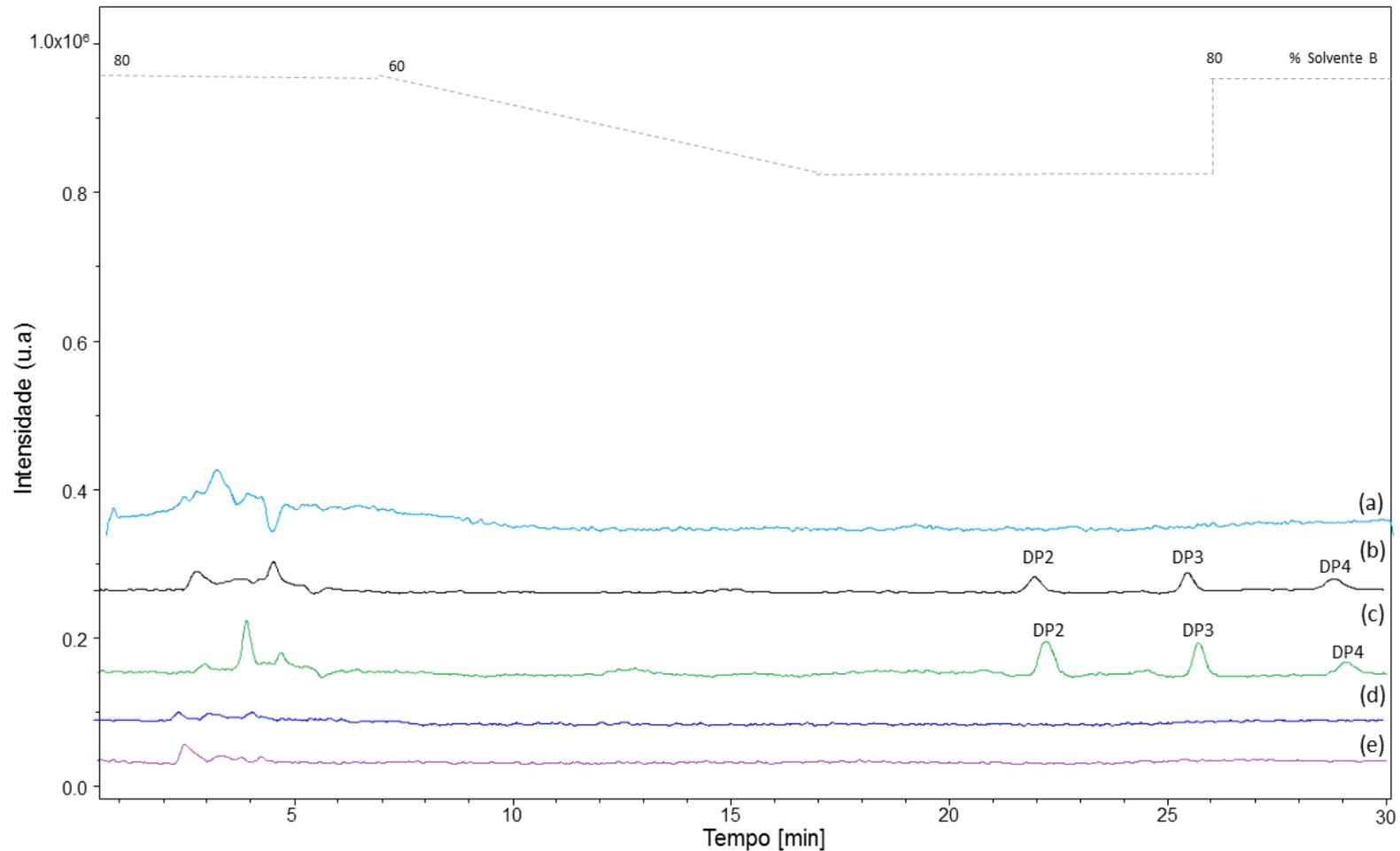


Figura 35: UHPLC-ESI(+)-MS) dos produtos da reação da enzima TfAA10-N^o produzida em biorreator e purificada por afinidade, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de fosfato de sódio pH 6,0 no tempo inicial (a) e após 72 h (b) a 50°C e 14000 rpm. Também é mostrado o controle na presença de enzima sem ácido ascórbico (c), e os e os controles negativos (sem enzima) na presença (d) e ausência de ácido ascórbico (e) após 72 h de reação. DPn indica os oligossacarídeos detectados com n unidades de glicose. A linha pontilhada indica a curva gradiente ao longo da cromatografia, sendo expressa em função de % do solvente B (acetonitrila com 0,1% de hidróxido de amônia), e coluna BEH amida a 40 °C.

Nas análises por UHPLC-ESI-MS foi possível visualizar sinais referentes aos oligossacarídeos de 2 a 4 unidades de glicose (DP2-DP4) nos ensaios contendo enzima após 72 h de reação (Figura 35b e c), que por sua vez, não foram visualizados nos controles negativo (na ausência da enzima – Figura 35d e e) e nem no tempo 0 h (Figura 33a Porém não houve diferença na utilização ou não do doador de elétrons (ácido ascórbico) (Figura 35 b e c). O mesmo perfil foi observado nas análises por MALDI-TOF MS, no qual é mostrado o ensaio na presença de enzima e de ácido ascórbico em relação aos controles após 72 h (Figura 36) e deste ao longo dos tempos reacionais, 0, 24 e 72 h (Figura 37).

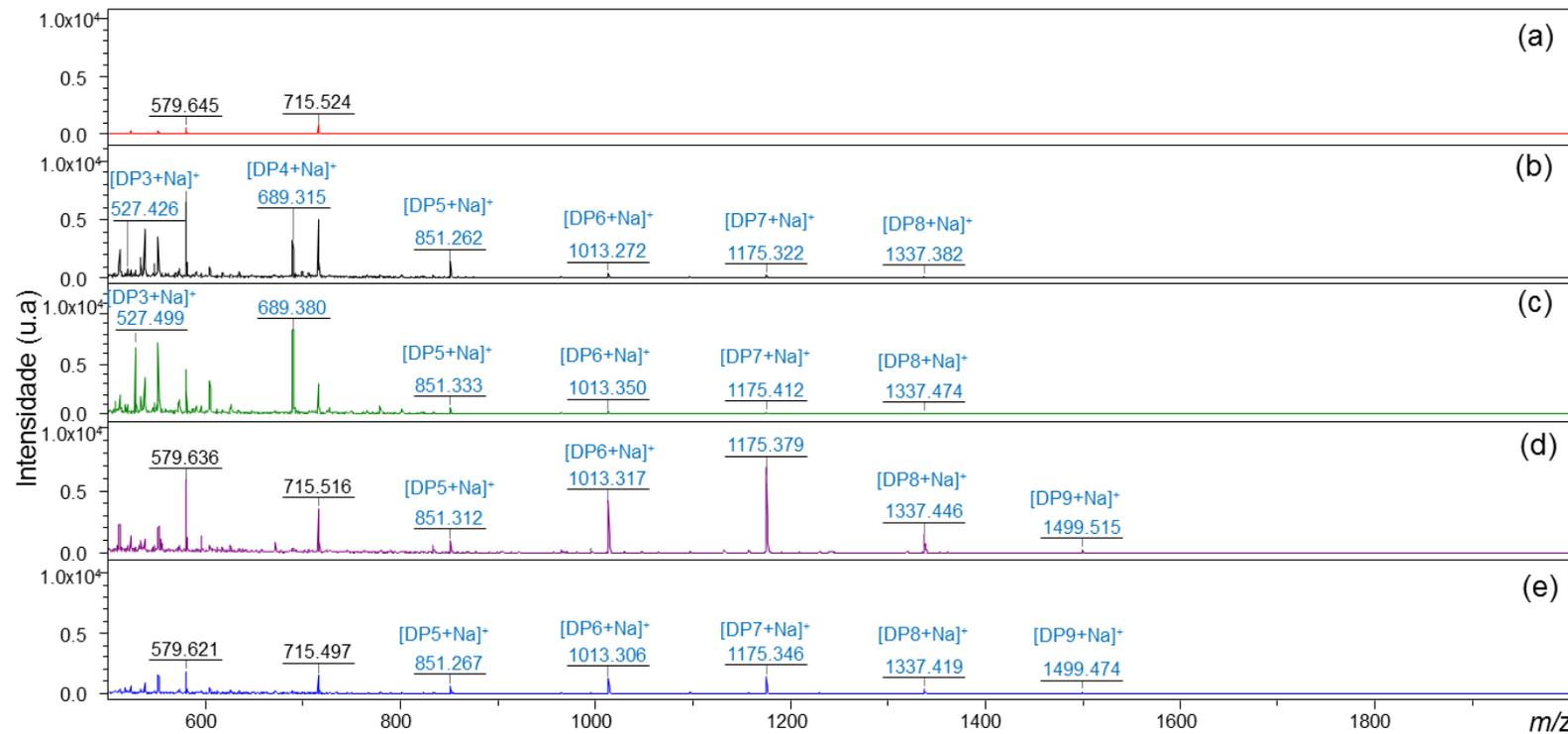


Figura 36: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da enzima TFAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de fosfato de sódio pH 6,0 após 72 h a 50°C e 14000 rpm. São mostrados os espectros referentes a matriz, branco da análise (a), dos ensaios na presença da enzima com (b) e sem ácido ascórbico (c) e também os controles negativos, na ausência da enzima, com (d) e sem ácido ascórbico (e). Os oligossacarídeos detectados como adutos de sódio [DPn+Na]⁺ estão indicados em azul.

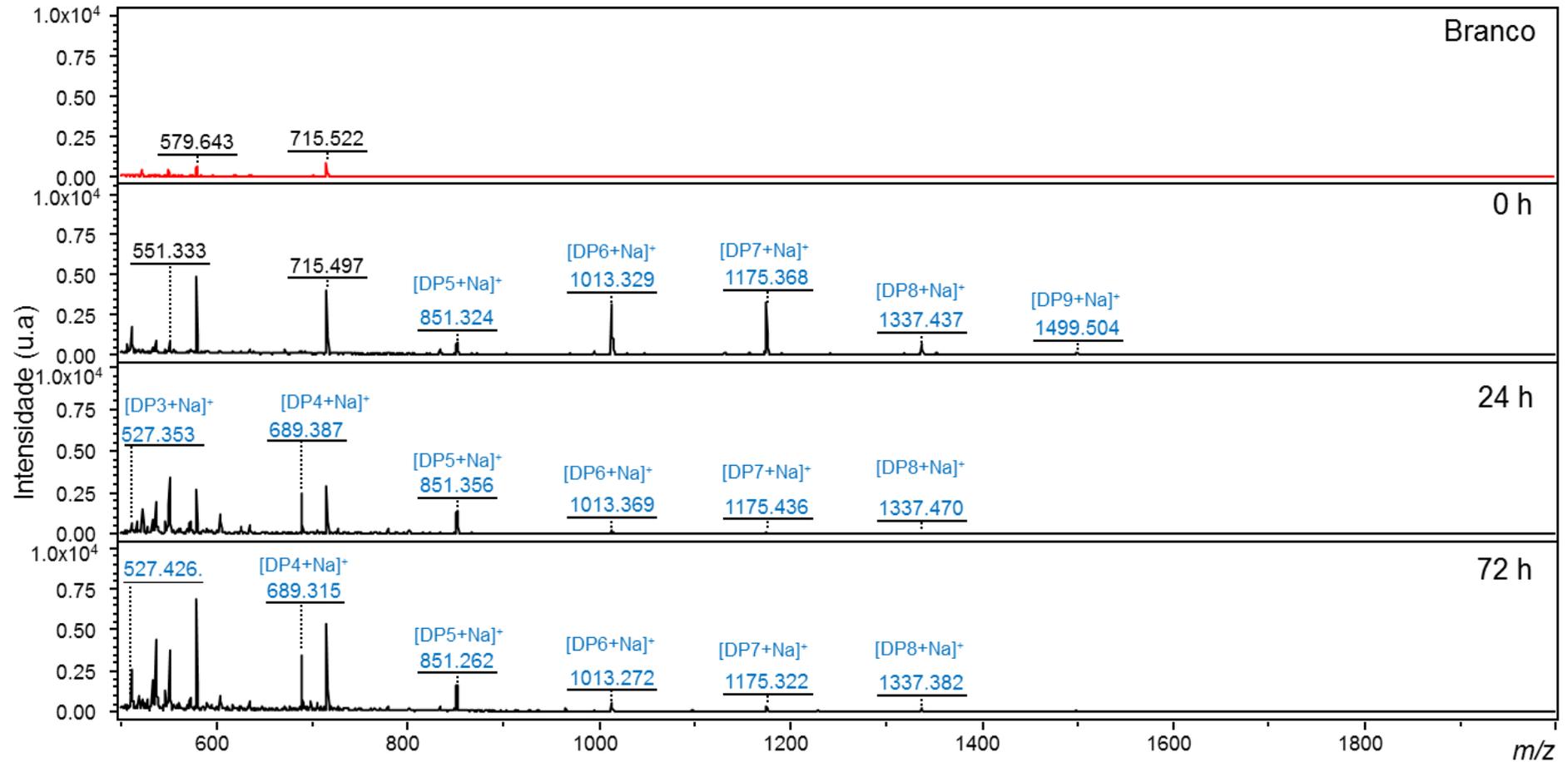


Figura 37: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da enzima TFAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, na presença de ácido ascórbico, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de fosfato de sódio pH 6,0 ao longo dos tempos reacionais de 0, 24 e 72 h, a 50°C e 14000 rpm. Em vermelho é mostrado o branco da análise (espectro da matriz DHB).

Nas análises por MALDI-TOF MS (Figuras 36 e 37) são visualizados íons referentes a oligossacarídeos DP3 a DP9 com aduto de sódio. No qual os íons referentes aos oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose (DP5-DP7) são visualizados em todos os ensaios (Figura 36) e tempos reacionais (Figura 37). O íon referente ao DP9 só é detectado nos controles negativos (na ausência da enzima - Figura 36d e Figura 36e), e no tempo reacional inicial do ensaio contendo enzima (Figura 37). Já os íons referentes à celotriose (DP3) e celotetraose (DP4) foram detectados apenas nos ensaios contendo enzima (Figura 36b e Figura 36c) e a partir do tempo 24 h (Figura 37).

Apesar disso, nenhum oligossacarídeo oxidado foi detectado (por nenhum dos métodos analíticos) na presença da enzima e do doador de elétron para que comprovasse a ação oxidativa da LPMO. Enquanto que a formação de oligossacarídeos com menor grau de polimerização (DP2 por UHPLC-ESI-MS; DP3 e DP4 por UHPLC-ESI-MS – Figura 35 e MALDI-TOF MS – Figuras 36 e 37) nos ensaios contendo enzima, independente da presença ou não de ácido ascórbico, sugerem uma provável ação hidrolítica da TfAA10-N nas condições testadas.

Destaca-se que a degradação parcial de produtos oxidados podem conduzir à formação de produtos nativos (WESTERENG *et al.*, 2017), quando a clivagem oxidativa ocorre próxima á extremidade redutora do substrato (no caso de oxidação em C1) ou terminal não-redutor (no caso da oxidação em C4), conforme mostrado na Figura 38. Isso poderia justificar a provável atividade hidrolítica que as LPMOs apresentaram nestas condições.

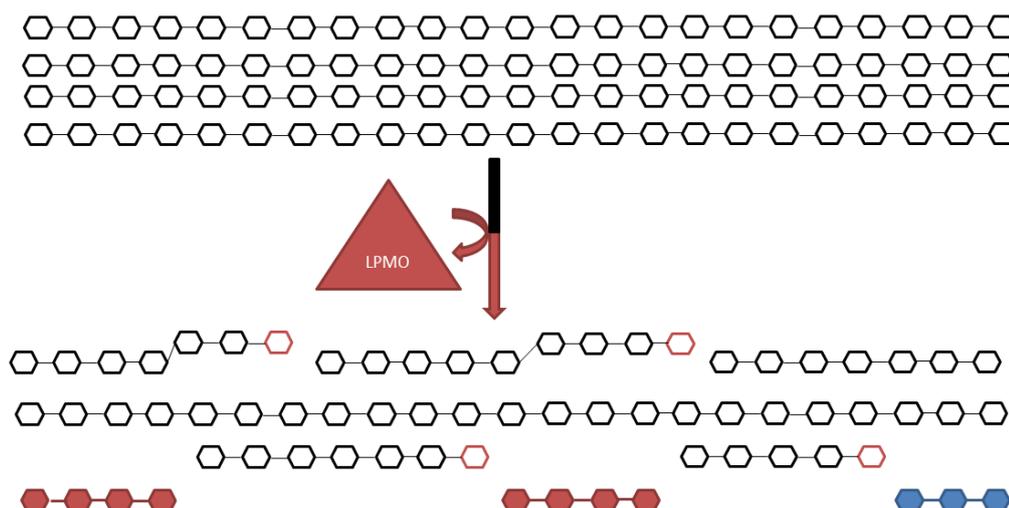


Figura 38: Representação esquemática da atuação das LPMOs na celulose com liberação de oligossacarídeos oxidados e nativos. Adaptado de Horn *et al.* (2012) e Westereng *et al.* (2017). A fibra de celulose está contornada em preto e os eventos de oxidação em vermelho. A clivagem oxidativa das LPMOs pode resultar em produtos solúveis (azul e vermelho) em menor quantidade e produtos insolúveis (preto) em maior quantidade.

Notavelmente, a atividade aparente de hidrolases também são reportadas por Beeson *et al.* (2012) e por Westereng *et al.* (2017) como associadas a pequenas quantidades hidrolases contaminantes, uma vez que estes normalmente possuem taxas catalíticas muito superiores às LPMOs.

Ensaio em outras condições reacionais (tampão, pH e dosagem de enzima e substrato) foram testadas para investigação da ação da LPMO TfAA10-N, na forma de extrato bruto e purificada por afinidade. Estes ensaios podem ser verificados no próximo item.

5.2.4.2 Análise do produto da reação da TfAA10-N em PASC e tampão de acetato de sódio por UHPLC-ESI-MS e MALDI-TOF MS

Novas condições reacionais foram utilizadas para o estudo da atividade da TfAA10-N produzida em biorreator, na forma de extrato bruto e purificada por afinidade. Nesses ensaios outro tampão de reação foi empregado (acetato de sódio) com pH inferior (pH = 5,2) aos ensaios anteriores (6,0). Além disso, foi utilizada uma maior dosagem de LPMOs (3,7 µg/mL) e de substrato celulósico PASC (12 mg/mL), conforme indicado por Tanghe *et al.* (2015) e descrito na Tabela abaixo.

Tabela 11: Condições da reação enzimática com a TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por His-Tag, em substrato PASC.

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-N (3,7 µg/mL)	TfAA10-N (3,7 µg/mL)	-	-
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão	Acetato de sódio (10 mM, pH = 5,2)			

*Volume final de reação = 100 µL, Agitação= 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 24 e 72 h.

Os produtos da reação da TfAA10-N, purificada por afinidade, em substrato celulósico do tipo PASC nas condições reacionais com tampão de acetato de sódio (Tabela 10) foram avaliados por UHPLC-ESI-MS (Figura 39) e MALDI- MS (Figura 40 e Figura 41).

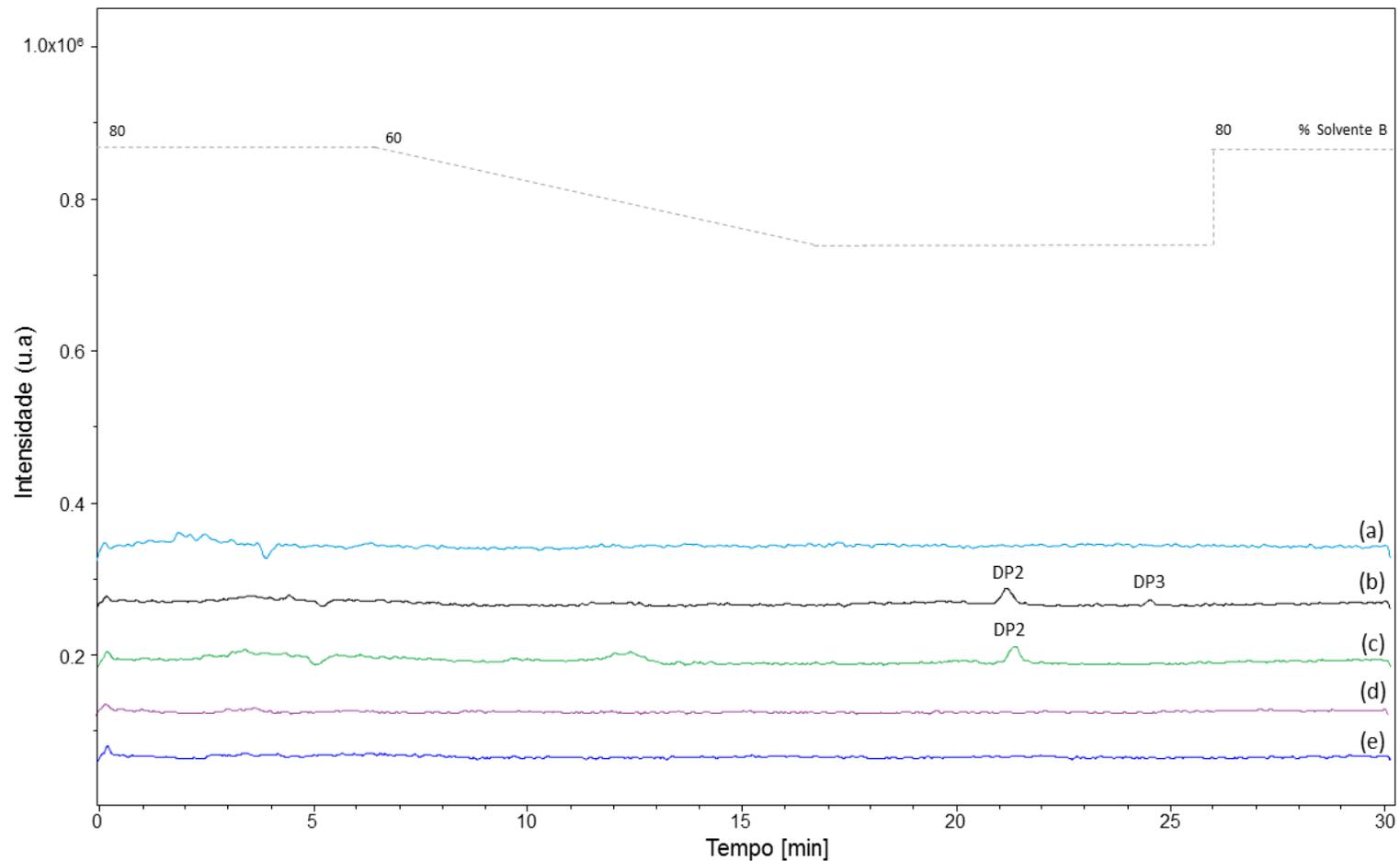


Figura 39: UHPLC-ESI(+)-MS) dos produtos da reação da enzima TfAA10-N^r produzida em biorreator e purificada por afinidade, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de acetato de sódio pH 5,2 no tempo inicial (a) e após 72 h (b) a 50°C e 14000 rpm. Também é mostrado o controle na presença de enzima sem ácido ascórbico (c), e os e os controles negativos (sem enzima) na presença (d) e ausência de ácido ascórbico (e) após 72 h de reação. DP_n indica os oligossacarídeos detectados com n unidades de glicose. A linha pontilhada indica a curva gradiente ao longo da cromatografia, sendo expressa em função de % do solvente B (acetonitrila com 0,1% de hidróxido de amônia), e coluna BEH amida a 40 °C.

Nota-se que nas análises por UHPLC-ESI(+)-MS foi possível detectar íons referente á celobiose (DP2) e celotriose (DP3) no ensaio na presença de enzima e de ácido ascórbico (Figura 39b), apenas a celobiose no ensaio na presença de enzima e ausência de ácido ascórbico (Figura 39c). Esses oligossacarídeos não foram detectados no tempo reacional inicial (0 h, Figura 39a) e nem nos controles negativos (Figura 39d e e), evidenciando que estes compostos foram produzidos pela ação da enzima. O mesmo perfil de degradação de substrato celulósico PASC pela ação enzimática pode ser visualizado por MALDI-TOF MS (Figura 40 e Figura 41).

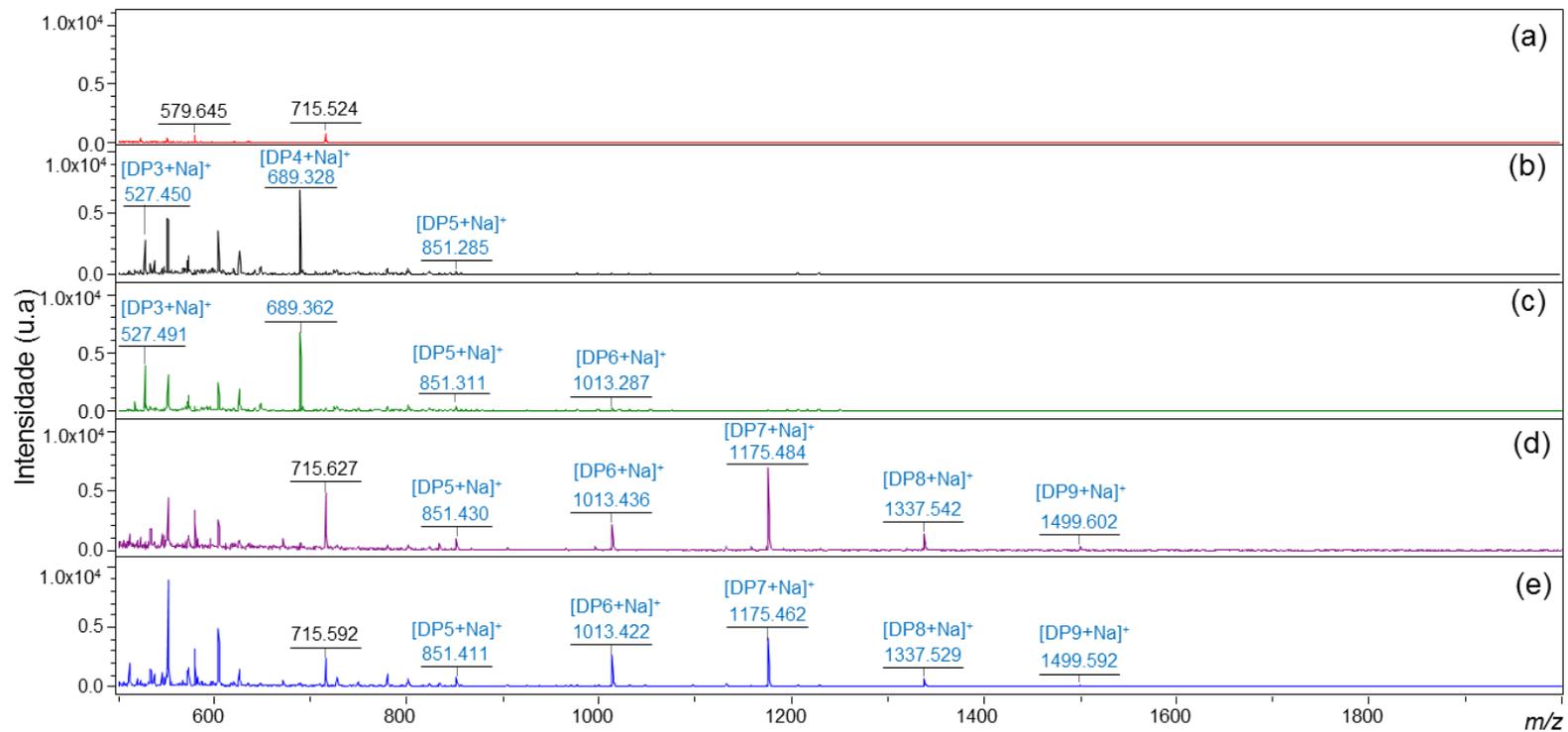


Figura 40: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da enzima TfAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de acetato de sódio pH 5,2 após 72 h a 50°C e 14000 rpm. São mostrados os espectros referentes a matriz, branco da análise (a), dos ensaios na presença da enzima com (b) e sem ácido ascórbico (c) e também os controles negativos, na ausência da enzima, com (d) e sem ácido ascórbico (e). Os oligossacarídeos detectados como aduto de sódio $[DPn+Na]^+$ estão indicados em azul.

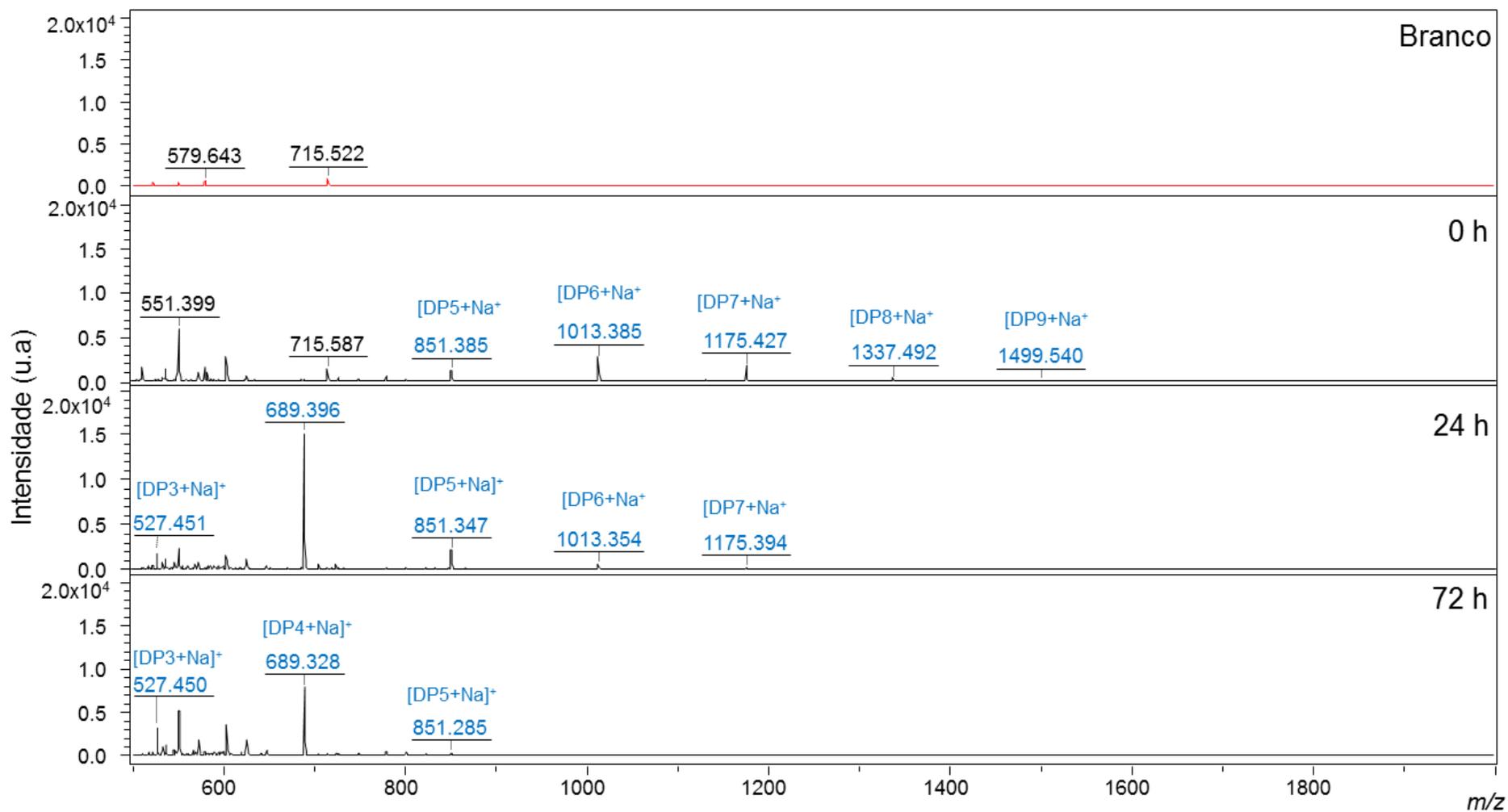


Figura 41: MALDI(+)-MS dos produtos da reação da enzima TFAA10-N, produzida em biorreator e purificada por afinidade, na presença de ácido ascórbico, utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de acetato de sódio pH 5,2 ao longo dos tempos reacionais de 0, 24 e 72 h, a 50°C e 14000 rpm. Em vermelho é mostrado o branco da análise (espectro da matriz DHB).

Nas análises por MALDI-TOF MS foi possível notar que a celopentaose (DP5) foi detectada em todos os tempos reacionais e ensaios (Figura 40 e Figura 41). Oligossacarídeos com 6 e 7 unidades de glicose (DP6 e DP7) foram detectados em alguns ensaios na presença de enzima, porém em maior intensidade nos controles negativos negativo (na ausência de enzima Figura 40 d e e) e no tempo inicial (0 h – Figura 41). Enquanto oligossacarídeos DP8 e DP9 foram detectados apenas nos controles (Figura 40 d e e) e no tempo reacional inicial (0 h). A celotriose (DP3) e celotetraose (DP4) foram detectadas apenas nos ensaios contendo a enzima, independente da presença ou ausência de ácido ascórbico, e nos tempos reacionais de 24 e 72 h.

Ao analisar os produtos da reação da enzima TfAA10-N, purificada por afinidade, em substrato celulósico do tipo PASC nas condições reacionais com tampão de acetato de sódio pH = 5,2 (Figuras 36, 37 e 38) foi possível perceber a hidrólise neste tampão foi mais expressiva quando comparada com o tampão de fosfato de sódio pH = 6,0 (Figuras 33, 34 e 35). Percebe-se que há diferença entre os perfis dos ensaios na presença e ausência de enzima, porém não há diferença na utilização ou não de ácido ascórbico (AA), como doador de elétrons (Figura 40b e c).

Os oligossacarídeos oxidados, que eram esperados como produtos da reação na presença do doador de elétrons, não foram detectados por nenhum dos métodos analíticos. Porém, esses resultados indicam que nestas condições estas enzimas estejam hidrolisando o substrato celulósico.

Ensaio com a TfAA10-N, produzida em biorreator na forma de extrato bruto, em tampão de acetato de sódio pH 5,2 também foram realizadas Como descrito na Tabela abaixo.

Tabela 12: Condições da reação enzimática com o extrato bruto da TfAA10-N, produzida em biorreator, em substratoPASC.

Reagentes	Ensaio	Controle 01	Controle 02	Controle 03
Enzima	TfAA10-N (3,7 µg/mL)	TfAA10-N (3,7 µg/mL)	-	-
Substrato celulósico	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)	PASC (2 mg/mL)
Doador de elétrons	Ácido ascórbico (2 mM)	-	Ácido ascórbico (2 mM)	-
Tampão	Acetato de sódio (10 mM, pH = 5,2)	Acetato de sódio (10 mM, pH = 5,2)	Acetato de sódio (10 mM, pH = 5,2)	Acetato de sódio (10 mM, pH = 5,2)

*Volume final de reação = 100 µL, Agitação= 1400 rpm, Temperatura = 50 °C e Tempos = 0, 24 e 72 h..

Esses foram analisados por MALDI-TOF MS e por UHPLC-ESI-MS, porém em virtude da complexidade da amostra apenas o segundo método analítico permitiu a avaliação dos produtos da reação, cujo perfil é apresentado na Figura 40.

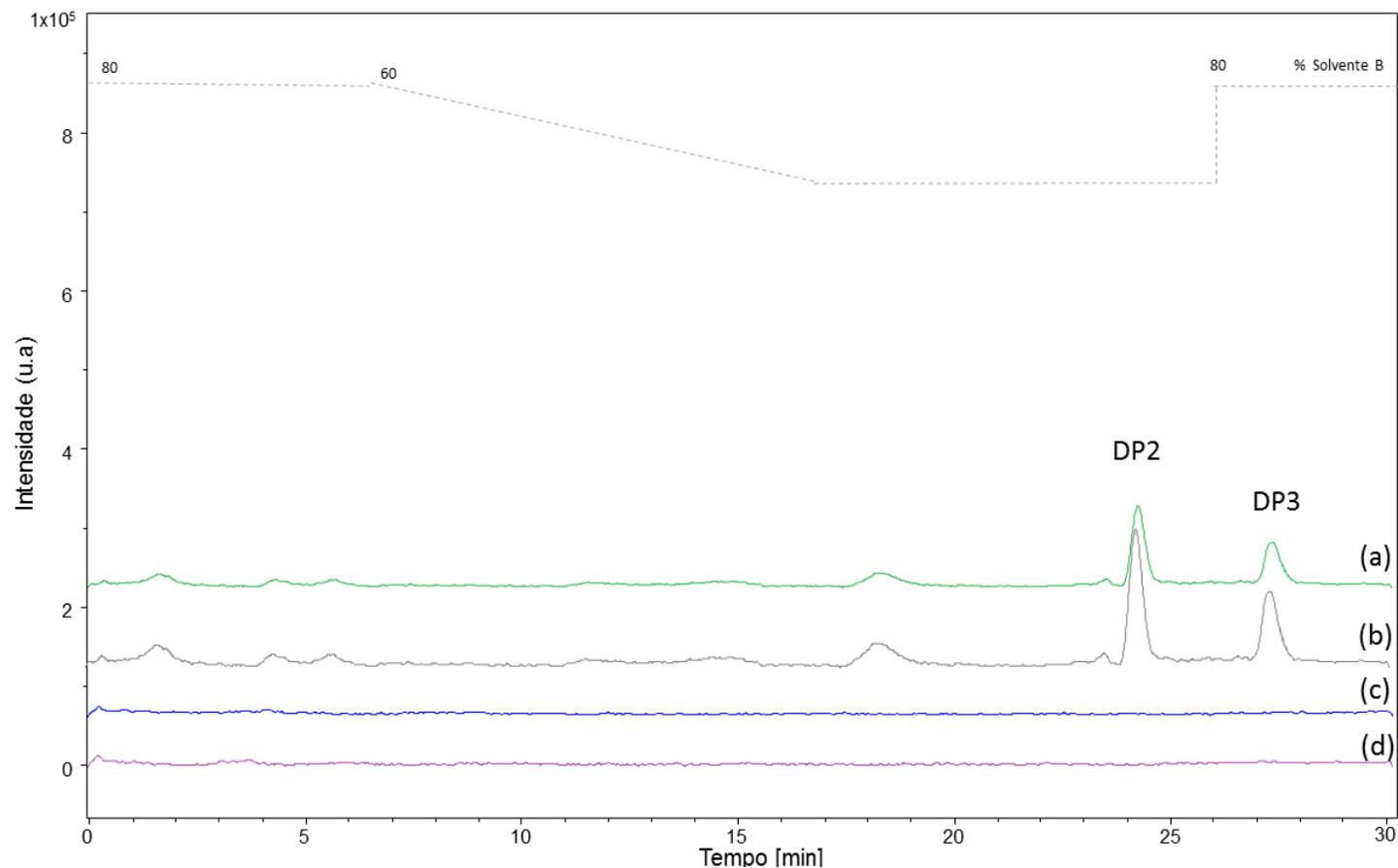


Figura 42: UHPLC-ESI(+)-MS) dos produtos da reação da enzima TfAA10-N, produzida em biorreator na forma de extrato bruto utilizando a celulose do tipo PASC como substrato e tampão de acetato de sódio pH 5,2 na presença de enzima e de ácido ascórbico (a) após 72 h de reação. Também são mostrados os controles na presença de enzima e sem ácido ascórbico (b), e os e os controles negativos (sem enzima) na presença (c) e ausência de ácido ascórbico (d). DPn indica os oligossacarídeos detectados com n unidades de glicose. A linha pontilhada indica a curva gradiente ao longo da cromatografia, sendo expressa em função de % do solvente B (acetonitrila com 0,1% de hidróxido de amônia), e coluna BEH amida a 40 °C.

Nas análises do produto da reação do extrato bruto da TfAA10-N em PASC por UHPLC-ESI(+)-MS foi possível detectar íons referente á celobiose (DP2) e celotriose (DP3) no ensaio na presença de enzima na presença (Figura 42a) e na ausência de ácido ascórbico (Figura 42b), que por sua vez não foram detectados nos controles negativos, na ausência da enzima (Figura 42c e d).

Nas condições testadas, nenhum oligossacarídeo oxidado foi detectado para que confirmasse a atividade da LPMO estudada. Porém a presença de oligossacarídeos nativos apenas nos ensaios na presença da enzima sugere uma ação hidrolítica. Nesse ensaio como a LPMO utilizada não foi submetida a uma prévia purificação a ação hidrolítica visualizada (Figura 42a e b) pode ser em virtude de algum contaminante do meio, justificando a maior intensidade dos oligossacarídeos obtidos em relação aos ensaios com a enzima purificada (Figura 39).

Destaca-se ainda que a clivagem parcial de alguns produtos oxidados (na forma C4) podem gerar oligossacarídeos nativos. Dessa forma, caso esses oligossacarídeos nativos detectados tenham sido gerados por ação oxidativa da TfAA10-N nessas condições, provavelmente algum componente do extrato bruto tenha sido utilizado como doador de elétrons, tendo em vista que não houve diferença entre o perfil das reações com enzima na presença e ausência de ácido ascórbico.

6 CONCLUSÃO

A análise por MALDI-TOF MS empregando o ácido sinapílico e modo linear positivo permitiu avaliar as enzimas utilizadas nas reações enzimáticas, bem como detectar a pureza destas. Assim, o método se consolida como uma alternativa ou uma análise complementar ao uso de gel desnaturante (SDS-PAGE) pela praticidade e rapidez.

O estudo foi capaz de mostrar que a TfAA10 expressa recombinantemente em *Khomagataella phaffii* não apresenta atividade enzimática, ao contrário da modelo expressa em *Escherichia coli*. Isso provavelmente está relacionada aos padrões de glicosilação que esta LPMO apresentou quando foi expressa em hospedeiro eucarioto (levedura *K. phaffii*), que foi verificado pelo aumento do tamanho molecular da enzima (25 e 24 kDa para as TfAA10-O e TfAA10-N, respectivamente, comparada ao tamanho predito de 21 kDa)

Os métodos analíticos e as condições reacionais foram alterados a fim de favorecer a melhor avaliação dos produtos da reação da TfAA10 (TfAA10-O e TfAA10-N) em substratos celulósicos. Em relação as condições reacionais estudadas, os tampões de incubação foram os que mais influenciaram no perfil dos produtos obtidos. No qual, os mais indicados para reações de clivagem por LPMOs são os tampões como acetato de amônio ou ainda aqueles que utilizam sódio em sua composição (fosfato e/ou acetato de sódio).

O método analítico por MALDI-TOF MS foi otimizado quanto aos parâmetros instrumentais (modo e intensidade do *laser*, *shots*, frequência e ganho do detector). E também quanto ao modo de preparo de amostra (método de aplicação, concentração de matriz, proporção amostra-matriz e adição de cloreto de sódio). Destaca-se que a dificuldade da avaliação dos produtos da reação do extrato bruto enzimático por MALDI-TOF MS, em virtude da supressão iônica e a possibilidade da LPMO estar atuando com baixa taxa de clivagem exigiu o desenvolvimento de um método analítico baseado em LC-MS. Esse método foi então aplicado para avaliação da TfAA10 produzida em biorreator.

A LPMO produzida em biorreator (TfAA10-N) apresentou uma possível ação hidrolítica em PASC, em todas as condições testadas e analisadas por MALDI-TOF MS e por UHPLC-ESI-MS. Destaca-se que a possibilidade da clivagem oxidativa gerar produtos internos referentes a oligossacarídeos nativos também justificam esta ação enzimática. Essa possível ação da TfAA10-N produzida em biorreator não foi verificada nas reações com as enzimas (TfAA10-O e TfAA10-N) produzidas em *erlenmeyer*, provavelmente devido as condições nesse sistema não garantir controle das condições de pH ao longo da produção.

Os métodos MALDI-TOF MS e UHPLC-ESI-MS empregados na análise dos produtos da reação enzimática de LPMOs mostraram ser complementares para o entendimento da ação dessas enzimas. Isso porque o MALDI-TOF MS permitiu a análise eficiente de oligossacarídeos de maior grau de polimerização (DP3-DP11), enquanto o LC-MS permitiu avaliação de oligossacarídeos menores (DP1-DP4), até mesmo em amostras complexas (extrato bruto). Dessa forma, esses métodos analíticos utilizados neste trabalho se tornam importantes para aplicações na caracterização de diversas LPMOs.

7 REFERÊNCIAS

AGGER, J.W.; ISAKEN, T.; VÁRNAI, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G.; WESTERENG, B. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **PNAS**, v.111, n.17, p.6287-6292, 2014.

AJANOVIC, A. Biofuels versus food production: Does Biofuels production increase food prices? **Energy**, v. 36, p. 2070-2076, 2011.

ARCHAMBAULT-LÉGER, V.; LOSORDO, Z.; LYND, L. R. Energy, sugar dilution, and economic analysis of hot water flow-through pre-treatment for producing biofuel from sugarcane residues. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 9, p. 95-108, 2014.

ARFI, Y.; SHAMSHOUM, M.; ROGACHEV, I.; PELEG, Y.; BAYER, E.A. Integration of bacterial lytic polysaccharide monooxygenases into designer cellulosomes promotes enhanced cellulose degradation. **PNAS**, v.111, n.25, p.9109-9114, 2014.

BARROS, J. S. **Análise de monoxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs) no processo de sacarificação da biomassa por espectrometria de massas**. Brasília. 2016.

BEESON, W. T.; VU, V. V.; SPAN, E. A.; PHILLIPS, C. M.; MARLETTA, M. A Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 923-46, 2015.

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. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 90, p. 1-14, 2015.

BEY M.; ZHOU, S.; POIDEVIN, L.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; BERRIN, J. G.; SIGOILLOT, J. C. Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (family GH61) from *Podospora anserina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p.488–496, 2013.

BHOWMICK, G. D.; SARMAH, A. K.; SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1144-1154, 2018.

BISSARO, B.; RØHR, Å.K.; MÜLLER, G.; CHYLENSKI, P.; SKAUGEN, M.; FORSBERG, Z.; HORN, S.J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJSINK, V.G.H. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 13, n. 10, p.1123-1128, 2017.

BOULOS, S.; NYSTROM, L. UPLC-MS/MS investigation of b-glucan oligosaccharide oxidation. **Analyst**, v. 141, p. 6533-6548, 2016.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v.31, n.3, 2008.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar** - Safra 2017/2018, v.4, n.1, Brasília, p.18, abril/2017. Disponível em:< http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_20_14_04_31_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_17-18.pdf> Acesso em: 10/01/2018.

DEMIRBAS, A. Biorefineries: Current activities and future developments. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 2782-2801, 2009.

DODD, D.; CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global change biology Bioenergy**. v.1,n.1, p.2-17, 2009.

EIBINGER, M.; GANNER, T.; BUBNER, P.; ROSKER, S.; KRACHER, D.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R.; PLANK, H.; NIDETZKY, B. Cellulose surface degradation by lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulose hydrolytic efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**. v.289,n.52, p.35929-35938, 2014.

FARINAS, C.S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. 13p. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.

FORSBERG, Z.; MACKENZIE, A.K.; SØRLIE M.; RØHR, Å.K.; HELLAND, R.; ARVAI, A.S. VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJSINK, V.G.H. Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenases. **PNAS**, v. 111, n. 23, p. 8446-8451, 2014.

FRANSEN, K. E. H.; SIMONS, T. J. E. A. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. **Nature Chemical Biology**, p. 1-8, 2016.

FROMMNHAGEN, M.; SFORZA, S.; WESTPHAL, A. H.; VISSER, J.; HINZ, S. W. A.; KOETSIER, M. J.; BERKEL, W. J. H.; GRUPPEN, H.; KABEL, M. A. Discovery of combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase. **Biotechnology and Biofuels**. v.8, n.101, 2015.

GHATGE, S. S.; TELKE, A. A.; WAGHMODE, T. R.; LEE, Y.; LEE, K. W.; OH, D. B.; SHIN H. D.; KIM, S. W. Multifunctional cellulolytic auxiliary activity protein HcAA10-2 from *Hahella chejuensis* enhances enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 99, n. 7, p. 3041-3055, 2015.

GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. **Plant Physiology**, v.153, p.444-455, 2010.

GROSS, J.H. **Mass Spectrometry**. 1 ed. Heidelberg: Springer, p.113-120. 2004.

GUDMUNDSSON, M.; KIM, S.; WU, M.; ISHIDA, T.; MOMENI, M.H.; VAAJE-KOLSTAD, G.; LUNDBERG, D.; ROYANT, A.; STÅHLBERG, J.; EIJSINK, V.G.;

BECKHAM, G.T.; SANDGREN, M. Structural and electronic snapshots during the transition from a Cu(II) to Cu(I) metal center of a lytic polysaccharide monooxygenase by X-ray photoreduction. **The Journal of Biological Chemistry**. v.289, n.27, p.18782-92, 2014.

HARRIS, D. C. Espectrometria de massas. Capítulo 22. *In: Análise química quantitativa*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 523-524, 2008.

HARRIS, P. V.; WELNER, D.; McFARLAND, K.C.; RE, E.; POULSEN, J-C, N.; BROWN, K.; SALBO, R.; DING, H.; VLASENKO, E.; MERINO, S.; XU, F.; CHERRY, J.; LARSEN, S.; LEGGIO, L.L. Stimulation of lignocellulose biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, p. 3305-3316, 2010.

HEDEGARD, E.D.; RYDE, U. Multiscale modelling of Lytic Polysaccharide Monooxygenases. **ACS Omega**, v.2, p.536-545. 2017.

HENDRICKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v.100, p.10-18, 2009.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3ed. Chichester: Wiley, p.2007.

HORN, S.J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, n.45, 12 p., 2012.

IEA - International Energy Agency Bioenergy. Task 42 Biorefinery. 2010. Disponível em: <http://www.biorefinery.nl/fileadmin/biorefinery/docs/Brochure_Totaal_definitief_HR_opt.pdf> Acesso 09/01/2018. ISAKSEN, T. *et al.* A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 5, p. 2632-2642, January 2014.

KITTL, R.; KRACHER, D.; BURGSTALLER, D.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R. Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monooxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 79, p. 1-13, 2012.

KRUER-ZERHUSEN, N.; ALAHUHTA, M.; LUNIN, V.V.; HIMMEL, M.E.; BOMBLE, Y.J.; WILSON, D.B. Structure of a *Thermobifida fusca* lytic polysaccharide monooxygenase and mutagenesis of key residues. **Biotechnology for Biofuels**. v.10, n. 243, 12 p., 2017.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. A two-parameter kinetic model based on a time-dependent activity coefficient accurately describes enzymatic cellulose digestion. **Biochemistry**, v.52, n.33, p.5656-5664, 2013.

LESK, A.M. **Introdução a Bioinformática**. 2ed. São Paulo: Artmed, p.74, 2008.

LEVASSEUR, A.; DRULA, E.; LOMBARD, V.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, n.41, 2013.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.

LO LEGGIO, L.; SIMMONS, T.J.; POULSEN, J.C.; FRANDBSEN, K.E.; HEMSWORTH, G.R.; STRINGER, M.A.; VON FREIESLEBEN, P.; TOVBORG, M.; JOHANSEN, K.S.; DE MARIA, L.; HARRIS, P.V.; SOONG, C.L.; DUPREE, P.; TRYFONA, T.; LENFANT, N.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G.J.; WALTON, P.H. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monoxygenase. **Nature Communications**, London, v. 6, artigo 5961, 2015.

LOMBARD, V.; GOLACONDA, R. H.; DRULA, E.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 42, n. D1, p. D490–D495, 2014.

LOOSE, J.S.M.; FORSBERG, Z.; FRAAJE, M.W.; EIJSINK, V.G.H.; VAAJE-KOLSTAD, G. A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholera* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monoxygenase. **FEBS Letters**, v.588, n.18, p.3435-3440, 2014.

LOOSE, J. S. M.; FORSBERG, Z.; KRACHER, D.; SCHEIBLBRANDNER, S.; LUDWIG, R.; EIJSINK, V.G.; VAAJE-KOLSTAD, G. Activation of bacterial lytic polysaccharide monoxygenases with cellobiose dehydrogenase. **Protein Science**, v. 25, p. 2175-2186, 2016.

LYND, L. R.; WEIMER, P.J.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Review**, vol. 66, n. 3, p. 506. 2002.

LÜ, J.; SHEAHANB, C.; FU, P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. **Energy and Environmental Science**, v. 4, p. 2451-2466, 2011.

MARINAI, S. L. **Exploring methods for functional studies of CBM33-Type Lytic Polysaccharide Monoxygenases**. Norwegian University of Life Sciences, p. 143. 2013.

MORAIS, S.A.L. de.; NASCIMENTO, E.A. do; MELO, D.C. Análise da madeira de Pinus oocarpa parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v.29, n.3, 2005.

MOSER, F.; IRWAIN, D.; CHEN, S.; WILSON, D.B. Regulation and Characterization of *Thermobifida fusca* Carbohydrate-Binding Module proteins E7 and E8. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, 12 p., 2008.

NAIK, S. N.; VAIBHAV, V.G.; PRASANT, K.R.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.578-597, 2010.

NIZAMI, A. S.; REHAN, M.; WAGAS, M.; NAQVI, M.; OUDA, OK.M.; SHAHZAD, K.; MIANDAD, R.; KHAN, M.Z.; SYAMSIRO, M.; ISMAIL, I.M.I.; PANT, D. Waste biorefineries: enabling circular economies in developing countries. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 241, p. 1101-1117, 2017.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v.33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

PAYNE, C.M.; KNOTT, B.C.; MAYES, H.B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M.E.; SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; BECKHAM, G.T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v.115, n.3, p.1308-13448, 2015.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, v.54, p.559-568, 2008.

PHILIPPIDIS, G. P. Cellulase production technology: evaluation of current status. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. **Enzymatic conversion of biomass for fuel production**. Washington: ACS Symposium Series 566 - American Chemical Society, 1994. p. 188-217.

PONTE, X.; MONTESINOS-SEGUÍ, J.L.; VALERO, F. Bioprocess efficiency in *Rhizopus orizae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of PAOX1 is oxygen tension dependent. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 1954-1963, 2016.

PREMA, P. Xylanases. In: Pandey, A. *et al.* **Enzyme Technology**. New York: Springer, p. 333-337, 2010.

QUILAN, R.J. *et al.* Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **PNAS**, v.108, n.37, p.15079-15084, 2011.

RAMOS, R. C.; NACHILUK, K. Geração de Bionergia de Biomassa da Cana-de-açúcar nas Usinas Signatárias ao Protocolo Agroambiental Paulista (Safrá 2015/2016). **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 1-7, abril 2017.

REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, p. 485-497, 1950.

RODRIGUES, K. B.; MACÊDO, J. K. A.; TEIXEIRA, T.; BARROS, J. S.; ARAÚJO, A. C. B.; SANTOS, F. P.; QUIRINO, B. F.; BRASIL, B. S. A. F.; SALUM, T. F. C.; ABDELNUR, P. V.; FÁVARO, L. C. L. Recombinant expression of *Thermobifida fusca* E7 LPMO in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* and their functional characterization. **Carbohydrate Research**, v. 448, p. 175-181, 2017.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; VRIES, R.P.; MÄKELÄ, M. R. Planta-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.78,n.4, p.614-649, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, F.P. dos. **Expressão e produção de monoxigenases bacterianas em *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) para utilização como enzimas acessórias para desconstrução de biomassa.** 67 p. [Mestrado em Biotecnologia], Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2017.

SKOOG, D.A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** São Paulo: Cengage Learning, p.722-3,826,906-9, 2010.

SOREK, N.; YEATS, T. H.; SZEMENYEI, H. J.; YOUNGS, H.; SOMERVILLE, C. R.. The implications of Lignocellulosic Biomass Chemical Composition for the Production of Advanced Biofuels. **BioScience Advance**, p. 1-10, February 2014.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: a review. **Bioresource Technology**. v. 83, p.1-11, 2002.

SUN, J.; TIAN, C.; DIAMOND, S.; GLASS, N. L. Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic cell**. v. 11, n. 4, p. 482-493, 2012.

SZAKACS, G.; TENGERDY, R. P.; NAGY, V. Cellulases. In: PANDEY, A., *et al.* **Enzyme Technology.** New Delhi: Springer, p. 253-272, 2010.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. D. O. Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, Outubro/Dezembro 2004.

TANGHE, M.; DANNEELS, B.; CAMATTARI, A.; GLIEDER, A.; VANDENBERGHE, I.; DEVREESE, B.; STALS, I.; DESMET, T. Recombinant expression of Trichoderma reesei Cel 61A in *Pichia pastoris*: Optimizing Yield and N-terminal processing. **Molecular Biotechnology**, New York, p. 9, August 2015.

TEIXEIRA, T. S.; BARROS, J.S. de; MACÊDO, J.K.A.; RODRIGUES, K.B.; FÁVARO, L.C. de L.; SIQUEIRA, F.G. de; ABDELNUR, P.V. **Análise de oligossacarídeos da celulose por MALDI-TOF MS.** INSS 2177-0395. Brasília, v.11, p. 24. 2017.

VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; HORN, S.J.; LIU, Z.; ZHAI, H.; SORLIE, M.; EIJNSK, V.G. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, p. 219-222, 2010.

VAAJE-KOLSTAD, G.; HORN, S.J.; van AALTEN, D.M.; SYNSTAD, B.; EIJNSK, V.G. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 28492-28497, 2005.

VALENZUELA, S.V.; FERRERES, G.; MARGALEF, G.; ASTOR, F.J.J. Fast purification method of functional LPMOs from *Streptomyces ambofaciens* by affinity adsorption. **Carbohydrate Research**, v.7, n.448, p.205-211, 2017.

VAN BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry.** Widener University, Chester. PA, 1998.

VERMAAS, J.V.; CROWLEY, M.F.; BECKHAM, G.T.; PAYNE, C.M. Effects of lytic polysaccharide monooxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulases. **Journal of Physical Chemistry**, v.119, n.20, p.6129-6143, 2015.

VU, V. V.; BEESON, W.T.; PHILLIPS, C.M.; CATE, J.H.D.; MARLETTA, M.A. Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenase. **Journal of American Chemistry Society**, v. 136, p. 562-565, 2014.

WESTERENG, B.; ARNTZEN, M.Ø.; AGGER, J.W.; VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJNSK, V.G.H. Analyzing activities of lytic polysaccharide monooxygenases by liquid chromatography and Mass spectrometry. *In*: ABBOTT, D. W.; VAN BUEREN, A. L. **Protein-Carbohydrate Interactions: Methods and Protocols**. v. 1588, 2017. Cap. 7, p. 71-92.

WESTERENG, B.; AGGER, J.W.; HORN, S.J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; AACHMANN, F.L.; STENSTROM, Y.M.; EIJNSK, V.G. Efficient separation of oxidized cell-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monooxygenases. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, p. 144-152, 2013.

WESTERENG, B.; ISHIDA, T.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WU, M.; EIJSINK, V. G. H.; IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; STAHLBERG, J.; HORN, S. J.; SANDGREN, M. The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metaldependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. *PloS One*, San Francisco, v. 6, n. 11, artigo e27807, 2011.

WOOD, T. M. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. **Method in Enzymology**, San Diego, p. 19-25, 1988.

ZHANG, J.; ZHANG, J.; LIN, L.; CHEN, T.; ZHANG, J.; LIU, S.; LI, Z.; OUYANG, P. Dissolution of microcrystalline cellulose in phosphoric acid—molecular changes and kinetics. **Molecules**, v. 14, p. 5027-5041, 2009.

APÊNDICE

Apêndice A: Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das LPMOs.

✓ Sequência de aminoácidos da TfAA10 (LPMO de *Thermobifida fusca* YX)

HGSVINPATRNYGCWLRWGHDLNPNMQYEDPMCWQAWQDNPNAMWNWNGLYRDWVGGNHRA
ALPDGQLCSGGLTEGGRYRSMDAVGPWKTTDVNNTFTIHLVDQASHGADYFLVYVTKQGFDPPTQPL
TWDSLELVHQTGSYPPAQNIQFTVHAPNRSGRHVVFVFTIWKASHMDQTYYLCSVDN

Códigos de acesso da LPMO bacteriana modelo:

ID NCBI: AAZ55306.1

ID Uniprot: Q47QG3

ID PDB: 4GBO

Classificada como AA10

Caracterizada como C1/C4 no banco de dados de domínio público CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes Database*)

184 aminoácidos

21 kDa

pI ~6,0

✓ TfAA10-O

Códon otimizado da LPMO de *Thermobifida fusca* YX (TfAA10-O)

CACGGTTCCGTTATCAACCCAGCTACTAGAACTACGGTTGTTGGTTGAGATGGGGTCACGATCAC
TTGAACCCAAACATGCAATACGAGGACCCAATGTGTTGGCAAGCTTGGCAAGATAACCCAAACGC
TATGTGGAACCTGGAACGGTTTGTACAGAGATTGGGTTGGTGGTAACCACAGAGCTGCTTTGCCAGA
TGGTCAATTGTGTTCCGGTGGTTTGACTGAGGGTGGTAGATAACAGATCTATGGACGCTGTTGGTCC
ATGGAAAACACTACTGACGTTAACAACACTTTACTACTGACTTGTACGACCAAGCCTTCTCACGGTGCT
GACTACTTTTTGGTTTACGTTACTAAGCAGGGTTTCGACCCAACACTACTCAGCCATTGACTTGGGATT
CCTTGAGTTGGTTACCAGACTGGTTCTTACCCACCAGCTCAGAACATCCAGTTTACTGTTACGCG
TCCAAACAGATCCGGTAGACACGTTGTTTTACTATTTGGAAGGCTTCCACATGGACCAGACTTA
CTACTTGTGTTCTGATGTTAAC

✓ TfAA10-N

Códon nativo da LPMO de *Thermobifida fusca* YX (TfAA10-N)

CACGGGTCGGTCATCAACCCCGGACCCGTAACACTACGGTTGCTGGCTGCGTTGGGGCCACGACCAC
CTCAACCCCAACATGCAGTACGAAGACCCCATGTGCTGGCAGGCCTGGCAGGACAACCCCAACGC
CATGTGGAACCTGGAACGGCCTGTACCGGACTGGGTCGGCGGCAACCACCGGGCTGCCCTCCCCGA
CGGCCAGCTGTGCAGCGGTGGCCTCACCGAAGGCGGCGCTACCGCTCCATGGACCGCTAGGCC
GTGGAAGACCACCGTCAACAACACTTACCATCCACCTGTACGACCAAGCCAGCCAGCCACGGCG
CAGACTACTTCTGGTCTACGTCACCAAGCAGGGTTCGACCCGACCAACCCAGCCGCTGACCTGGG
ACAGCCTGGAACCTGGTGCACCAGACCGGACGCTACCCCGGCCAGAACATCCAGTTACCGTCC
ACGCCCCAACCGCAGCGGCCGACGTTGTTTACCATCTGGAAGGCTTCGCACATGGACCAGA
CCTACTACCTGTGCAGCGACGTGAAC

Apêndice B: Condições das reações com TfAA10.

Tabela B 1: Condições reacionais para ensaios enzimáticos utilizando TfAA10-O.

Nome ^{*1}	Enzima(s) utilizada(s)			Substrato (mg/mL)	[] AA ^{*3} (mM)	Tampão (Concentração, pH)	Volume final (µL)	Agitação (rpm)	Tempos (h)
	Produção	Purificação	Dosagem ^{*2}						
TfAA10-O	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1 µM	PASC (2 mg/mL)	2	Acetato de amônio (5 mM, pH 6,0)	200	900	0, 24 e 48
TfAA10-O	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1 µM	Avicel (2 mg/mL)	2	Acetato de amônio (5 mM, pH 6,0)	200	900	0, 24 e 48
TfAA10-O	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1, 2, 5 ou 10 µM	PASC (2 mg/mL)	1 ou 2	Acetato de amônio, (5 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 6, 24 e 48 h
TfAA10-O	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1, 2, 5 ou 10 µM	PASC (2 mg/mL)	1 ou 2	Fosfato de potássio, (5 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 6, 24 e 48 h
TfAA10-O	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1, 2, 5 ou 10 µM	PASC (2 mg/mL)	1 ou 2	Fosfato de sódio (5 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 6, 24 e 48 h
TfAA10-O	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1, 2, 5 ou 10 µM	PASC (2 mg/mL)	1 ou 2	Fosfato-salino (5 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 6, 24 e 48 h
TfAA10-O	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1 ou 10 µM	Avicel (2 mg/mL)	2	Fosfato de sódio (5 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 24 e 48 h
TfAA10-O	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1 ou 10 µM	Avicel (2 mg/mL)	2	Acetato de amônio (5 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 24 e 48 h

^{*1}TfAA10 com códon otimizado (RODRIGUES *et al.*, 2017) ^{*2}Para utilizar na concentração desejada realizou-se uma conversão para µM a partir do peso molecular e quantidade de proteína (mg/mL) através do software online *Graphpad* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform.cfm>). ^{*3}Concentração de ácido ascórbico (doador de elétrons).

Tabela B 2: Condições reacionais para ensaios enzimáticos utilizando TfAA10-O.

Nome *1	Enzima(s) utilizada(s)			Substrato (mg/mL)	[] AA *3 (mM)	Tampão (Concentração, pH)	Volume final (µL)	Agitação (rpm)	Tempos (h)
	Produção	Purificação	Dosagem*2						
TfAA10-N	<i>Erlenmeyer</i>	His-Tag	1 µM	PASC (2 mg/mL)	2	Acetato de amônio (5 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 24 e 48 h
TfAA10-N	<i>Erlenmeyer</i>	DEAE	1 µM	PASC (2 mg/mL)	2	Acetato de amônio (10 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 24 e 48 h
TfAA10-N saturada com Cu ²⁺	<i>Erlenmeyer</i>	DEAE	1 µM	PASC (2 mg/mL)	2	Acetato de amônio (10 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 24 e 48 h
TfAA10-N saturada com Cu ²⁺	<i>Erlenmeyer</i>	DEAE	1 µM	DP6 (1 mg/mL)	2	Acetato de amônio (10 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 24 e 48 h
TfAA10-N	<i>Erlenmeyer</i>	-	1 µM	PASC (2 mg/mL)	2	Acetato de amônio (10 mM, pH 6,0)	100	1400	0, 24 e 48 h
TfAA10-N	Biorreator	His-Tag	1 µM	PASC (2 mg/mL)	1	Fosfato de sódio (10 mM pH 6,0)	200	1400	0, 24 e 72 h
TfAA10-N	Biorreator	His-Tag	3,7 µg/mL	PASC (12 mg/mL)	2	Acetato de sódio (10 mM, pH 5,2)	200	1400	0, 24 e 72 h
TfAA10-N	Biorreator	-	3,7 µg/mL	PASC (12 mg/mL)	2	Acetato de sódio (10 mM, pH 5,2)	200	1400	0, 24 e 72 h

*1TfAA10com códon otimizado (RODRIGUES *et al.*, 2017) *2Para utilizar na concentração desejada realizou-se uma conversão para µM a partir do peso molecular e quantidade de proteína (mg/mL) através do software online *Graphpad* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform.cfm>). *3Concentração de ácido ascórbico (doador de elétrons).

Apêndice C: Predição de glicosilação



NetNGlyc 1.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

Asn-Xaa-Ser/Thr sequons in the sequence output below are highlighted in blue.
Asparagines predicted to be N-glycosylated are highlighted in red.

Output for 'Sequence'

#####

Warning: This sequence may not contain a signal peptide!!

Proteins without signal peptides are unlikely to be exposed to the N-glycosylation machinery and thus may not be glycosylated (in vivo) even though they contain potential motifs.

SignalP-NN euk predictions are as follows:

#	name	Cmax	pos ?	Ymax	pos ?	Smax	pos ?	Smean	? D	?	SignalP-noTM
Sequence		0.110	70	0.129	11	0.183	1	0.132	0.131	N	0.450

SignalP output is explained at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/output.html>

#####

Name:	Sequence	Length:	187
	MHGSVINPATRNYGCWLRWGHDLNPNMQYEDPMCWQAWQDNPNAMWNWNGLYRDWVGGNHRAALPDGQLCSGGLTEGGR		80
	YRSMDAVGPWKTTDVTNTFTIHLVDQASHGADYFLVYVTKQGFDPPTQPLTWDSLELVHQTGSYPQAQNIQFTVHAPNRS		160
	GRHVVFTIWKASHMDQTYYLCSDVNFV		
		80
N.....		160
		240

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	96 NNTF	0.5242	(4/9)	+
Sequence	158 NRSR	0.5133	(6/9)	+

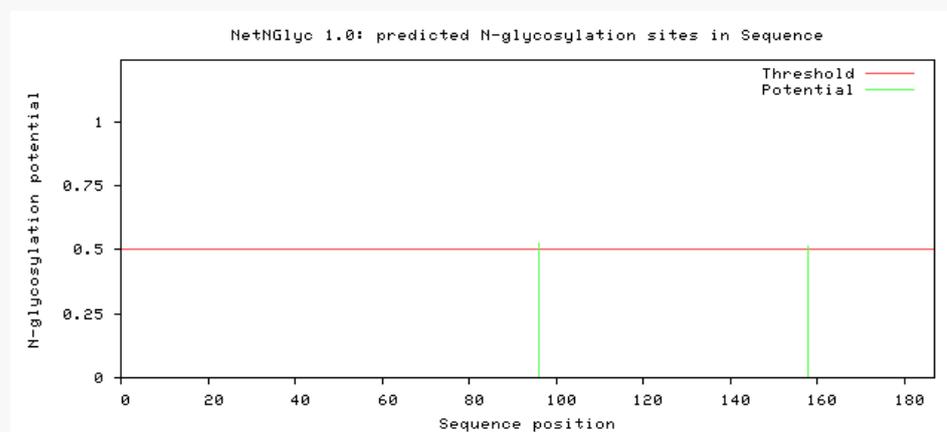
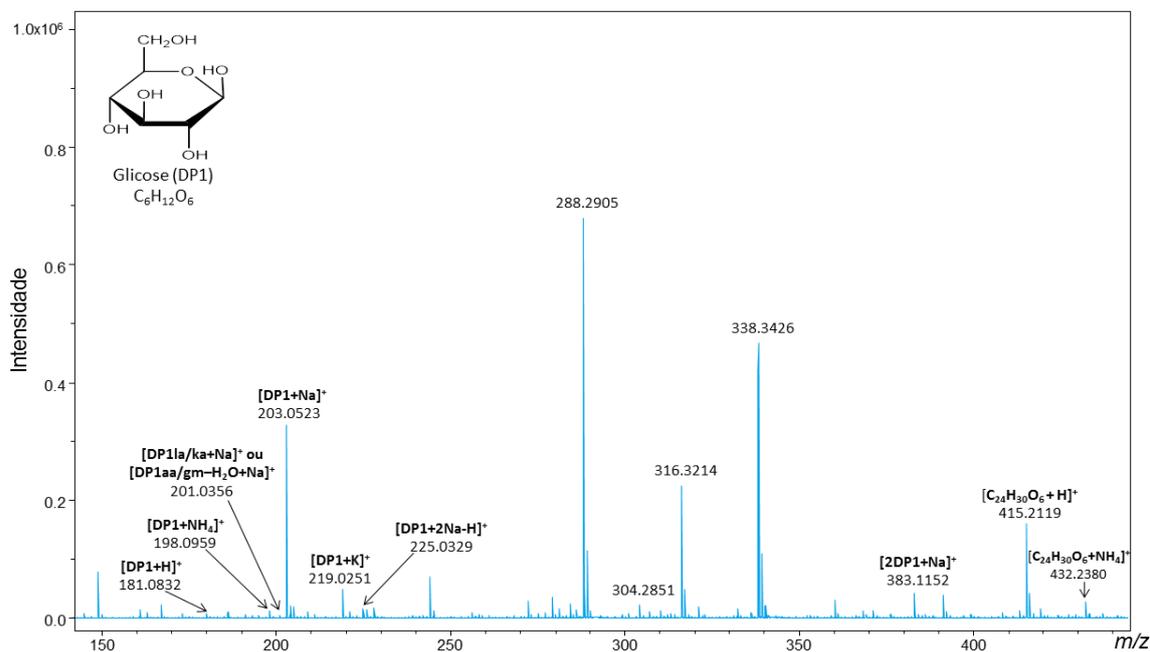
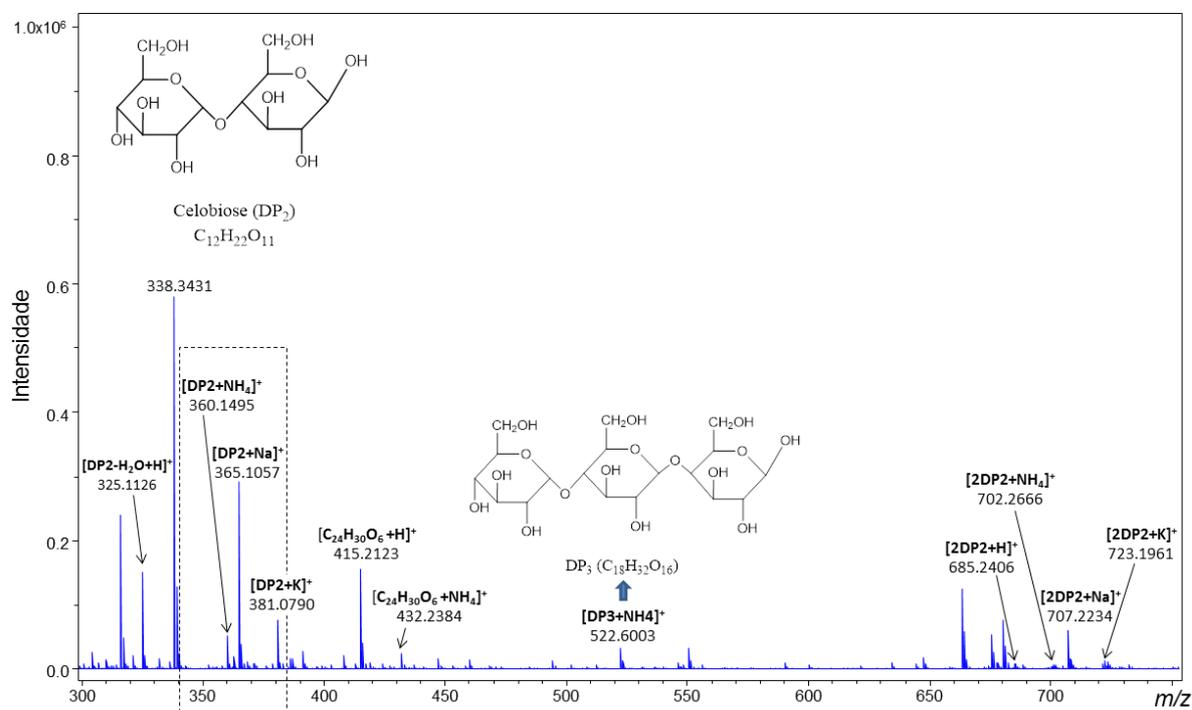


Figura C 1: Predição de N-glicosilações para a proteína de TfAA10 através da ferramenta NetNGlyc 1.0 do ExPASy (SIB Bioinformatics Resource Portal). Nota-se que há dois possíveis sítios de N-glicosilação.

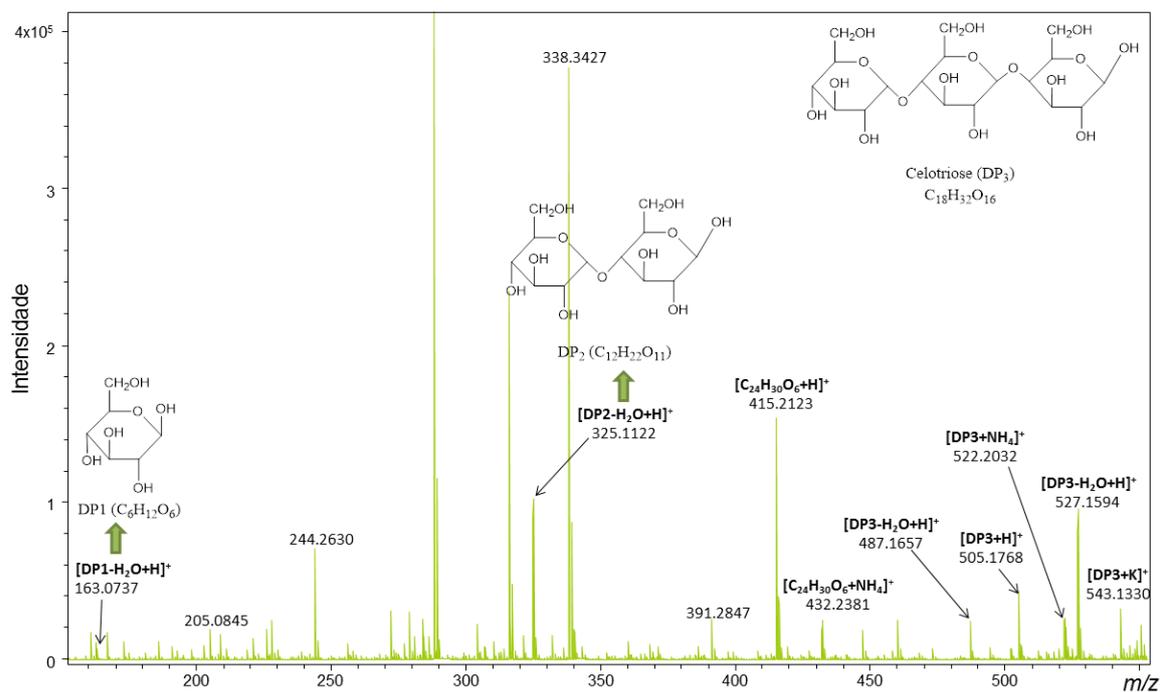
CENTER FOR BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS CBS		NetOGlyc 4.0 Server - prediction results	
		Technical University of Denmark	
##gff-version 2			
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13			
##date 18-2-17			
##Type Protein			
#seqname	source	feature	start end score strand frame comment
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	4 4 0.08504 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	10 10 0.0996819 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	72 72 0.646987 . . #POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	76 76 0.286294 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	83 83 0.811762 . . #POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	92 92 0.447206 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	93 93 0.43259 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	98 98 0.0926742 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	100 100 0.0676684 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	108 108 0.046333 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	119 119 0.129017 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	126 126 0.337289 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	127 127 0.187 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	131 131 0.124908 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	134 134 0.397408 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	141 141 0.443058 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	143 143 0.509668 . . #POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	153 153 0.0888418 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	160 160 0.0721996 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	167 167 0.0280398 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	172 172 0.0471819 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	177 177 6.75823e-06 . .
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	182 182 0.0027848 . .

Figura C 2: Predição de O-glicosilações para a proteína de TFAA10 através da ferramenta NetOGlyc 1.0 do ExPASy (SIB Bioinformatics Resource Portal). Nota-se que há três sítios de glicosilação.

Apêndice D: DIMS dos padrões de oligossacarídeos.

Figura D 1: ESI(+)-MS da glicose (1 $\mu\text{g/mL}$) em ACN:H₂O 3:1 com 0,1% NH₄OH.Figura D 2: ESI(+)-MS da celobiose (1 $\mu\text{g/mL}$) em ACN:H₂O 3:1 com 0,1% NH₄OH.

(A)



(B)

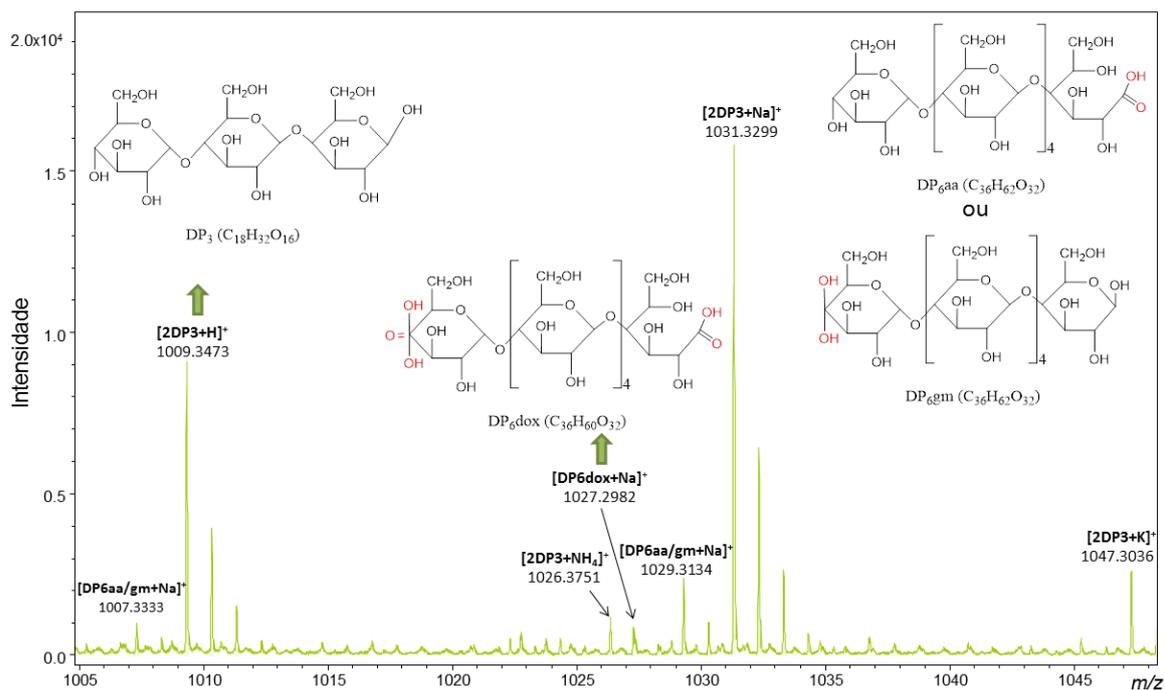
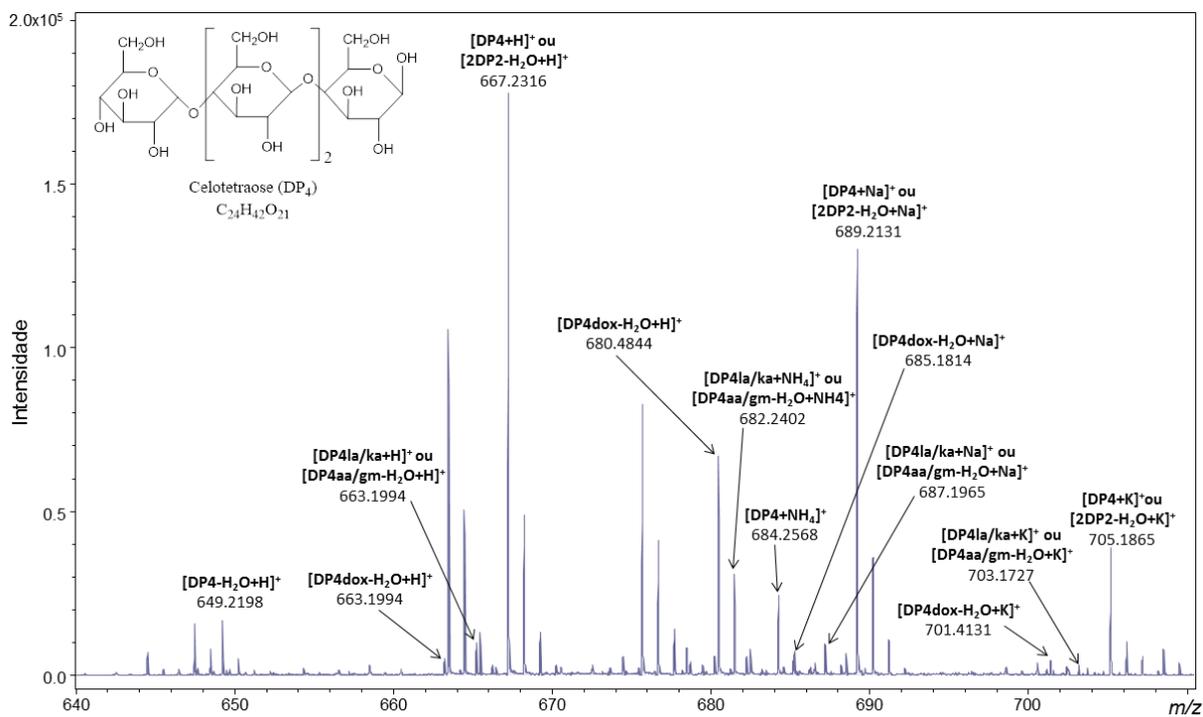


Figura D 3: ESI(+)-MS do padrão celotriose (1 $\mu\text{g/mL}$), em ACN:H₂O 3:1 com 0,1% NH₄OH nas faixas de massa (A) m/z 150-550 e (B) m/z 1005-1050.

(A)



(B)

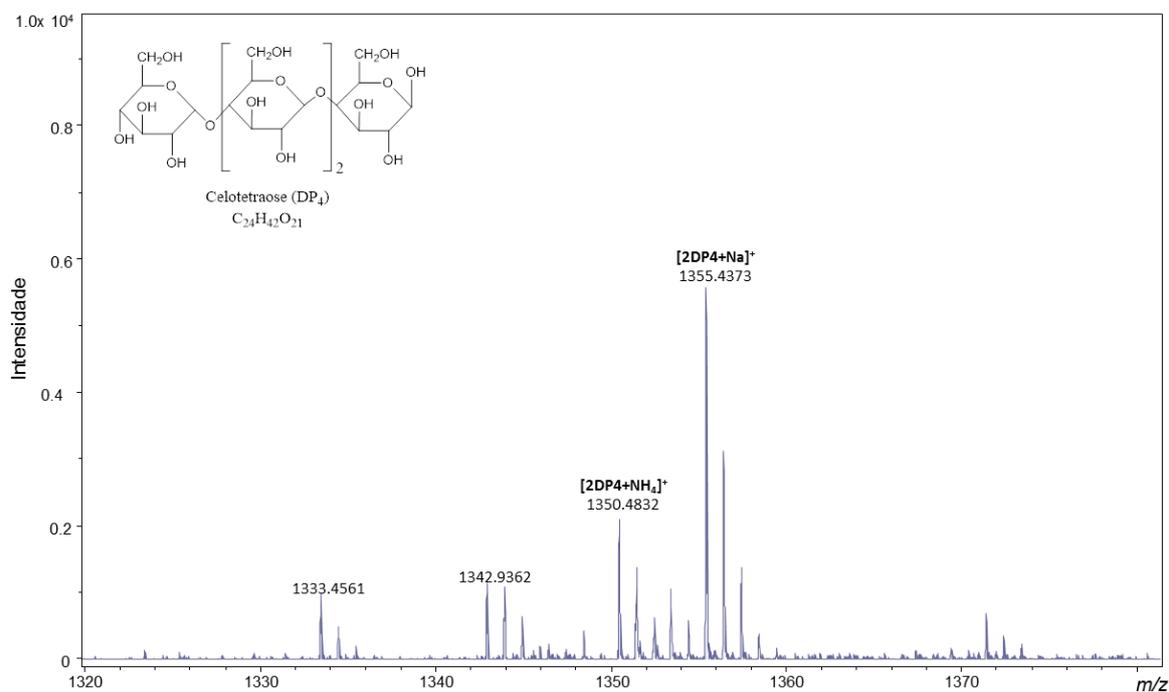


Figura D 4: ESI(+)-MS do padrão celotetraose (1 $\mu\text{g/mL}$) em ACN:H₂O 3:1 com 0,1% NH₄OH nas faixas de massa (A) m/z 100-1600 e (B) m/z 640-720 e (C) m/z 1320-1380 nas faixas de massa

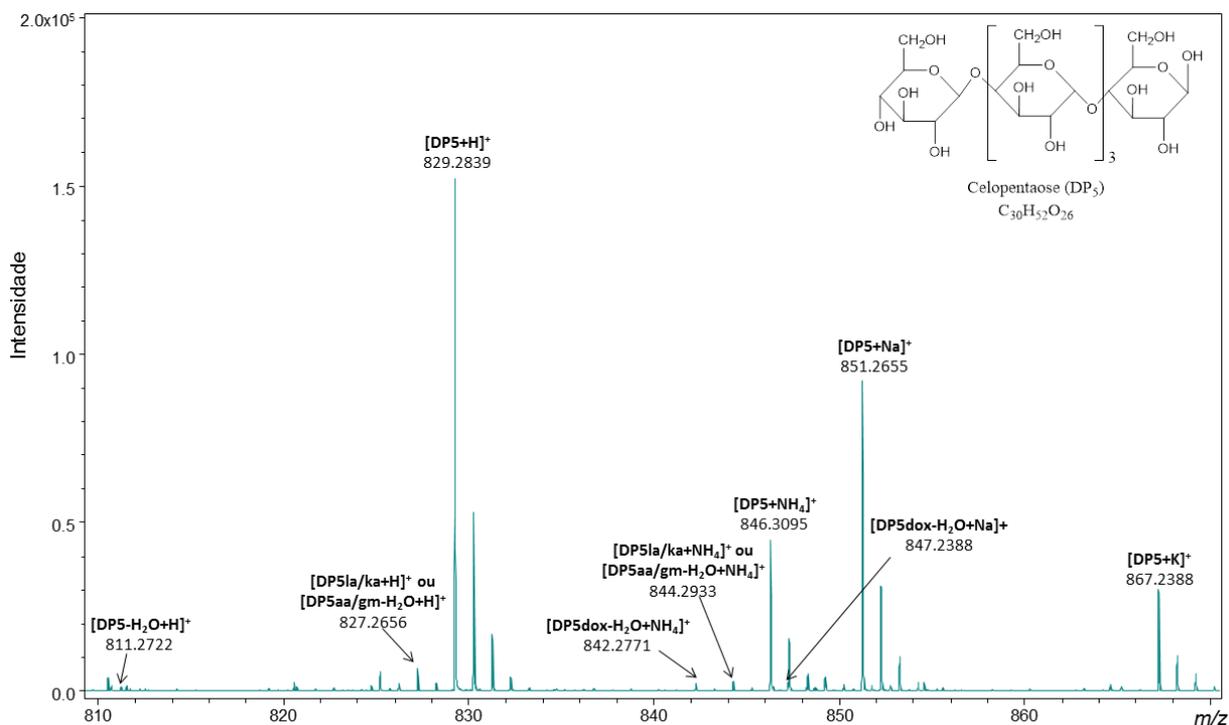


Figura D 5: ESI(+)-MS do padrão celopentose (1 µg/mL) em ACN:H₂O 3:1 com 0,1% NH₄OH

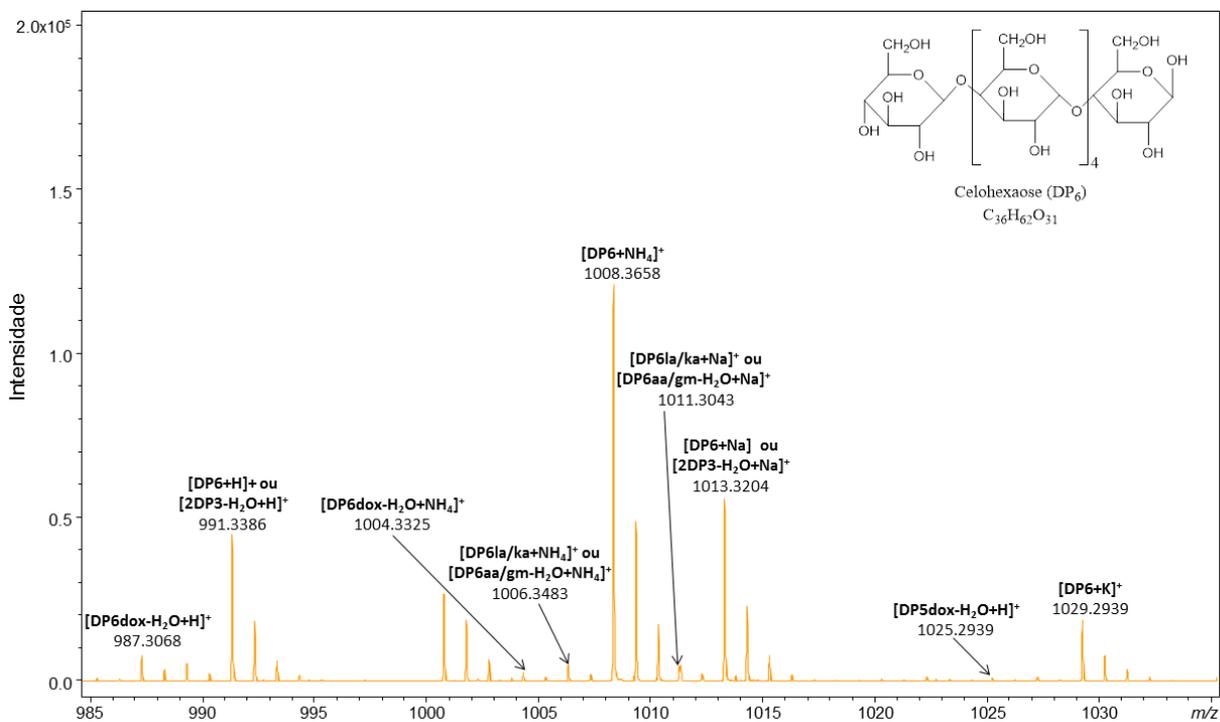


Figura D 6: ESI(+)-MS do padrão celohexose (1 µg/mL) em ACN:H₂O 3:1 com 0,1% NH₄OH.

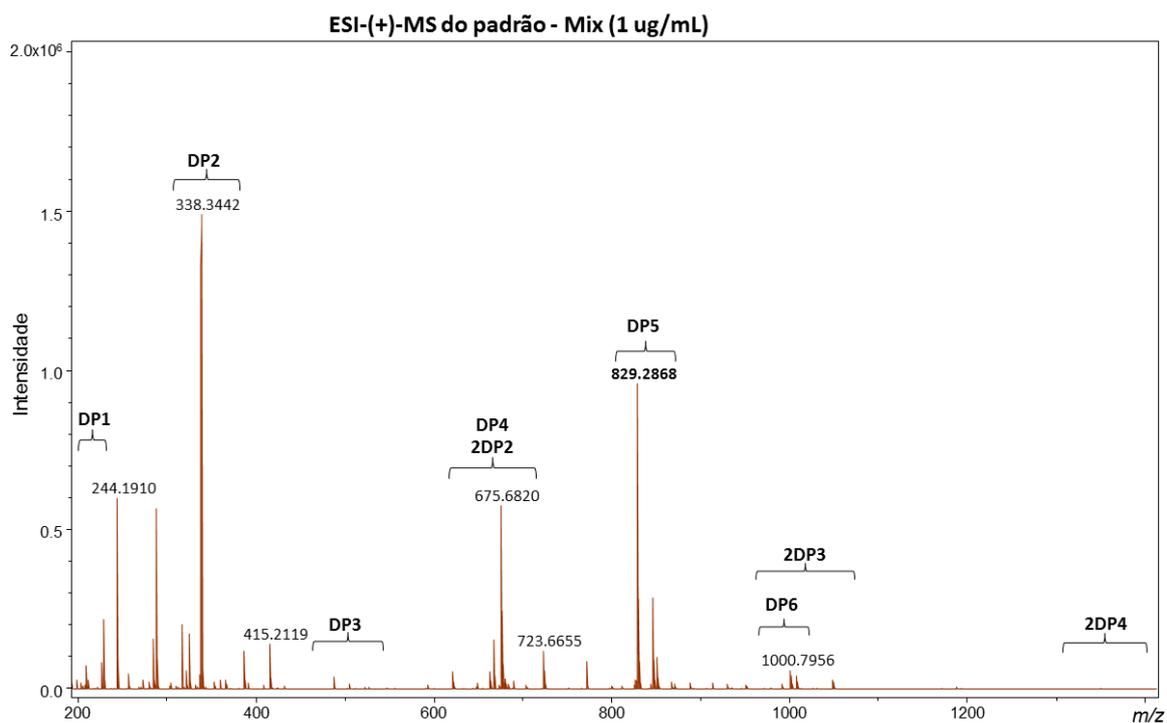


Figura D 7: ESI-(+)-MS da mistura de padrões de oligossacarídeos (glicose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose e celohexaose, cada um na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$), nas faixas de massa m/z 200-1400, indicando os oligossacarídeos identificados com diferentes graus de polimerização (DP_n , $1 \leq n \leq 6$).