

# Produção heteróloga e caracterização funcional de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos de fungos e bactérias

*Caio de Oliveira Gorgulho Silva*<sup>1</sup>, *Kelly Barreto Rodrigues*<sup>2</sup>, *Amanda Araújo Souza*<sup>3</sup>, *Antionielle Vieira Monclaro*<sup>4</sup>, *Gisele Soares Anastácio*<sup>5</sup>, *Thaís Demarchi Mendes*<sup>6</sup>, *Sílvia Belém Gonçalves*<sup>7</sup>, *Thaís Fabiana Chan Salum*<sup>8</sup>, *Dasciana de Sousa Rodrigues*<sup>9</sup>, *Mônica Caraméz Trichez Damaso*<sup>10</sup>, *Patrícia Verardi Abdelnur*<sup>11</sup>, *Léia Cecília de Lima Fávoro*<sup>12</sup>

## Resumo

Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) são enzimas de grande interesse industrial por serem capazes de despolimerizar polissacarídeos recalcitrantes, como a celulose, e apresentarem sinergismo com hidrolases na degradação destes polímeros, tendo potencial para aplicação em diversos processos. Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar LPMOs recombinantes de origem fúngica e bacteriana e desvendar seu potencial para aplicações biotecnológicas. Três LPMOs dos fungos *Neurospora crassa*, *Gloeophyllum trabeum* e *Botryobasidium botryosum* (subfamília AA9) e cinco LPMOs das bactérias extremófilas *Thermobifida fusca*, *Hahella ganghwensis*, *Salinispora pacifica*, *Verrucosipora maris* e *Moritella dasanensis* (subfamília AA10) foram selecionadas e expressas pela levedura metilotrófica *Pichia pastoris* X-33 (reclassificada como *Komagataella phaffii*). As enzimas recombinantes foram caracterizadas combinando ensaio fluorométrico e ensaio de despolimerização de celulose avaliado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Das oito LPMOs recombinantes obtidas, cinco foram caracterizadas e mostraram-se funcionais por pelo menos um dos métodos utilizados, sendo que três foram capazes de despolimerizar a celulose. A LPMO da bactéria *S. pacifica* apresentou regioseletividade C1/C4, enquanto as pertencentes a *H. ganghwensis* e *T. fusca* apresentaram regioseletividade C1, apresentando potencial para diferentes aplicações biotecnológicas. A capacidade de despolimerizar a celulose faz desse conjunto de LPMOs recombinantes um ativo tecnológico que poderá ser avaliado como insumo para o desenvolvimento de novos produtos/processos que dependem da despolimerização da celulose, p. ex.: sacarificação de biomassa lignocelulósica para produção de etanol 2G, ração animal, indústria têxtil, entre outras aplicações.

**Palavras-chave:** mono-oxigenases líticas de polissacarídeos, bactérias extremófilas, fungos filamentosos, celulose, espectrometria de massas, *Pichia pastoris*.

<sup>1</sup> Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaborador da Embrapa Agroenergia, caio.gorgulho@gmail.com

<sup>2</sup> Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, kellybiobarreto@gmail.com

<sup>3</sup> Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, amandhacoelho@gmail.com

<sup>4</sup> Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, antionielle@gmail.com

<sup>5</sup> Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, gisele.sa27@gmail.com

<sup>6</sup> Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thaís.demarchi@embrapa.br

<sup>7</sup> Engenheira Química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

<sup>8</sup> Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thaís.salum@embrapa.br

<sup>9</sup> Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

<sup>10</sup> Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

<sup>11</sup> Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

<sup>12</sup> Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

## Introdução

As mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (do inglês PMO – polysaccharide monooxygenase, ou LPMO – lytic polysaccharide monooxygenase) são enzimas que clivam as regiões cristalinas das moléculas de celulose e de outros polissacarídeos por um mecanismo oxidativo. Os polissacarídeos que são substrato para essas enzimas são a celulose, hemicelulose, o amido, a quitina, entre outros (Forsberg et al., 2019). A descoberta das LPMOs em fungos e em bactérias revolucionou o conceito de degradação de polissacarídeos na natureza na última década e, atualmente, são reconhecidas por apresentarem um sinergismo com hidrolases (celulases, hemicelulases, amilases, quitinases) na degradação de polissacarídeos, o que contribui para sua ampla aplicação biotecnológica. Este trabalho teve como objetivo produzir LPMOs recombinantes de diferentes fungos e bactérias e caracterizá-las quanto à funcionalidade do sítio ativo e capacidade de despolimerização de celulose, visando desvendar o potencial biotecnológico e possibilitar futuras aplicações.

## Material e Métodos

### Síntese de genes, clonagem, cultivo e análise de expressão heteróloga

Os genes foram selecionados na base de dados do GenBank e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado seguindo as estratégias de expressão heteróloga da Tabela 1. A clonagem foi confirmada pela análise do padrão de restrição com endonucleases específicas escolhidas de modo a não interferir no processamento N-terminal das LPMOs. A transformação de *P. pastoris* X-33, a análise de integração do gene alvo no genoma, bem como os cultivos foram realizados de acordo com as instruções do manual EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen), considerando cada estratégia escolhida (Tabela 1).

**Tabela 1.** Estratégias de expressão utilizadas no presente trabalho para obtenção de linhagens de *P. pastoris* X-33 recombinantes produtoras de LPMOs de fungos e de bactérias.

Origem (Espécie/Filo)	Família (Cazy)	Acesso GenBank	Vetor de expressão	Construção gênica	Peptídeo sinal	Forma recombinante	Cauda de poli histidina
<i>Neurospora crassa</i> (Ascomycota)	AA9	EAA36362.1	pPICZαA	cDNA sintético; códon otimizado	Alpha-factor	Proteína completa	Sim (His6-tag C-terminal)
<i>Gloeophyllum trabeum</i> (Basidiomycota)	AA9	AEJ35168.1	pGAPZB	cDNA sintético; códon nativo	Nativo	Domínio AA9	Sim (His6-tag C-terminal)
<i>Botryobasidium botryosum</i> (Basidiomycota)	AA9	KDQ09879.1	pPICZB	cDNA sintético; códon nativo	Nativo	Proteína completa	Não

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Origem (Espécie/Filo)	Família (Cazy)	Acesso GenBank	Vetor de expressão	Construção gênica	Peptídeo sinal	Forma recombinante	Cauda de poli histidina
<i>Thermobifida fusca</i> (Actinobacteria)	AA10	AAZ55306	pPICZαA	cDNA sintético; códon nativo	Alpha-factor	Proteína completa	Sim (His6-tag C-terminal)
<i>Hahella ganghwensis</i> (Proteobacteria)	AA10	WP_020410109	pPICZαA	cDNA sintético; códon nativo	Alpha-factor	Domínio AA10	Sim (His6-tag C-terminal)
<i>Salinispora pacifica</i> (Actinobacteria)	AA10	WP_018745623.1	pPICZαA	cDNA sintético; códon nativo	Alpha-factor	Domínio AA10	Sim (His6-tag C-terminal)
<i>Moritella dasanensis</i> (Proteobacteria)	AA10	WP_017222644.1	pGAPZαA	cDNA sintético; códon nativo	Alpha-factor	Domínio AA10	Sim (His6-tag C-terminal)
<i>Verrucosipora maris</i> (Actinobacteria)	AA10	AEB43663.1	pGAPZαA	cDNA sintético; códon nativo	Alpha-factor	Domínio AA10	Sim (His6-tag C-terminal)

## Atividade enzimática: ensaio fluorométrico e de espectrometria de massas

A funcionalidade das LPMOs purificadas foi avaliada indiretamente pela detecção da formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) utilizando o teste fluorométrico Amplex Red/Horseradish peroxidase (HRP) (Isaksen et al., 2014). Este teste se baseia na geração de  $H_2O_2$  como subproduto de uma reação secundária catalisada pelo sítio ativo das LPMOs na presença de agente redutor e na ausência de substrato. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando 10  $\mu$ M da LPMO purificada.

A capacidade de despolimerização de celulose pelas LPMOs recombinantes foi testada como descrito por Tanghe et al. (2015) e Silva et al. (2019), utilizando 1  $\mu$ M de enzima purificada, PASC (do inglês, phosphoric acid swollen cellulose) a 2 mg/mL como substrato e ácido ascórbico (2 mM) como agente redutor em tampão acetato de sódio 5 mM pH 4,5, a 50°C durante 24h sob agitação. Controles negativos na ausência de agente redutor e/ou enzima também foram realizados. Os produtos catalíticos foram analisados por cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas (HILIC-UHPLC-ESI-MS), como descrito por Silva et al. (2019).

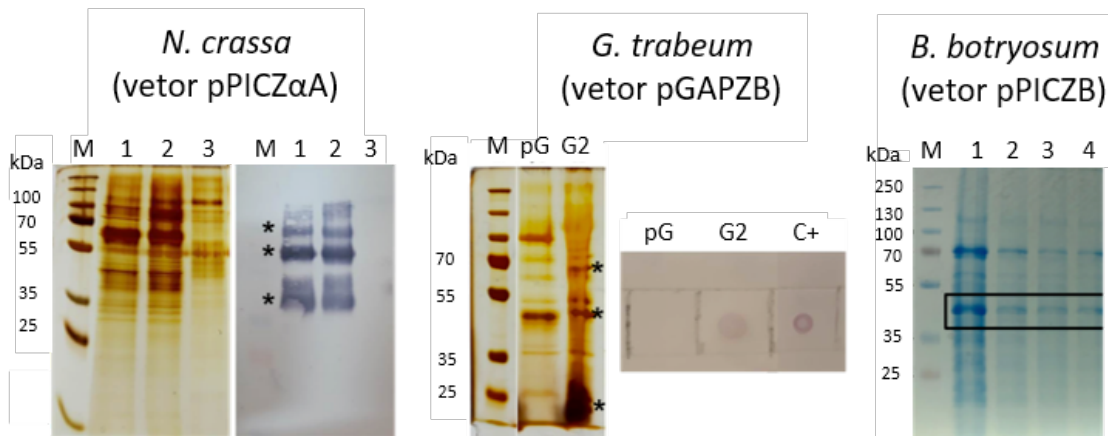
## Resultados e Discussão

### Produção heteróloga de LPMOs de fungos e bactérias por *P. pastoris*

A triagem de centenas de transformantes de *P. pastoris* X-33 resultou na seleção de linhagens recombinantes produtoras das oito LPMOs (três fúngicas e cinco bacterianas). A Figura 1 mostra o perfil proteico de transformantes produtores das LPMOs de *N. crassa*

(proteína completa), *G. trabeum* (domínio catalítico AA9) e *B. botryosum* (proteína completa). A produção recombinante de uma LPMO do fungo *B. botryosum* é relatada pela primeira vez no presente trabalho.

De modo geral, verificou-se que as LPMOs de origem fúngica apresentaram massa molecular superior ao previsto e/ou um perfil diferenciado de bandas com diferentes padrões de migração no gel de poliacrilamida, com massas variando entre 25 e 70 kDa (p. ex.: *N. crassa* e *G. trabeum*). Isso pode ser devido a ocorrência de modificações pós-traducionais conforme relatado para outras LPMOs de fungos produzidas por *P. pastoris* (Gaber et al., 2020).



**Figura 1.** Análise por SDS-PAGE, dot-blot e/ou Western blot do sobrenadante do cultivo de transformantes de *P. pastoris* X-33 produtores de três LPMOs de fungos. *N. crassa*: Na figura é mostrado o gel de poliacrilamida desnaturante 12% corado com nitrato de prata, exemplificando o perfil proteico do sobrenadante após cultivo em frascos (72h) de dois transformantes selecionados (1 e 2). Em 3 é mostrado o controle negativo (sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio pPICZαA). Também é mostrada a análise de Western blot correspondente, seguindo a mesma ordem. Os asteriscos exemplificam que a LPMO recombinante de *N. crassa* pode ter sido secretada de diferentes formas, com padrão de migração distinto no gel. M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Scientific. *G. trabeum*: Na figura é mostrado o gel de poliacrilamida desnaturante 12% corado com nitrato de prata, exemplificando o perfil proteico do sobrenadante após cultivo (48h em biorreator) de um transformante selecionado (G2), em comparação com o controle negativo (pG) correspondente a *P. pastoris* transformada com o vetor vazio pGAPZB. É possível observar diferentes formas com padrão de migração distinto, provavelmente correspondentes a LPMO recombinante. M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Scientific. Também é mostrada a análise de dot-blot correspondente, confirmando a presença da LPMO recombinante no respectivo sobrenadante, em comparação com os controles negativo (pG) e positivo (C+, correspondente a LPMO recombinante da bactéria *H. ganghwensis*). *B. botryosum*: A figura mostra o gel de poliacrilamida corado com Comassie, sendo possível observar 4 transformantes (1 a 4) produtores da LPMO de *B. botryosum* após 72h de cultivo em frascos, conforme destacado no retângulo. Neste gel não é mostrado o controle negativo correspondente ao sobrenadante de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio pPICZB. M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa – Thermo Scientific.

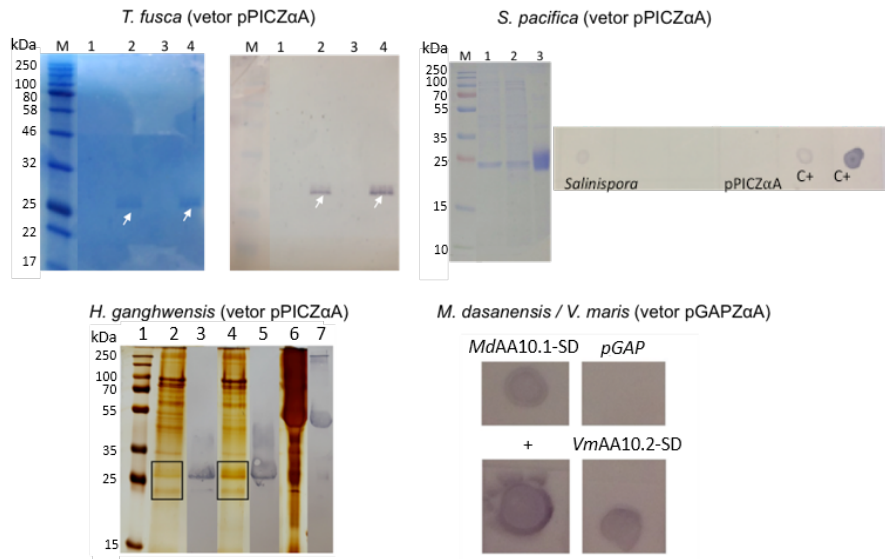
A Figura 2 mostra a expressão heteróloga da LPMO da bactéria *T. fusca* (proteína completa), bem como do domínio catalítico AA10 das LPMOs de *S. pacifica*, *H. ganghwensis*, *M. dasanensis* e *V. maris*. A produção recombinante de uma LPMO da bactéria *S. pacifica* é inédita. Verificou-se que as LPMOs bacterianas também apresentaram massas superiores ao previsto, provavelmente devido a alterações pós-traducionais, porém as proteínas migraram como bandas únicas no gel de poliacrilamida (p. ex.: *T. fusca*, *S. pacifica* e *H. ganghwensis*).

### Caracterização da atividade enzimática por ensaios fluorimétricos e por espectrometria de massas

A Tabela 2 mostra os resultados do teste de produção de peróxido de hidrogênio de cinco LPMOs recombinantes. Os ensaios foram realizados utilizando tampão e pH adequados para o funcionamento da peroxidase (fosfato de sódio; pH 7,4). Tais condições podem não ser adequadas para as diferentes LPMOs avaliadas. Em todo o caso, o resultado positivo do teste, comparado a todos os controles, indica que pelo menos o sítio ativo da proteína heteróloga está funcional, o que por sua vez indica que o processamento N-terminal da LPMO foi realizado de forma adequada por *P. pastoris*. Os resultados mostraram que o sítio ativo das cinco LPMOs recombinantes realizou a redução de O<sub>2</sub> para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença do doador de elétrons (ascorbato), e ausência de substrato celulósico, nas condições utilizadas.

**Tabela 2.** Caracterização funcional de LPMOs recombinantes quanto à capacidade de produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em ensaio fluorométrico Amplex Red/Horseradish peroxidase.

Origem da LPMO	Forma recombinante secretada e purificada	Amplex Red/ Horseradish peroxidase
<i>Neurospora crassa</i>	Proteína completa; His6-tag (C-terminal)	Positivo
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Domínio catalítico AA9; His6-tag (C-terminal)	Positivo
<i>Thermobifida fusca</i>	Proteína completa; His6-tag (C-terminal)	Positivo
<i>Hahella ganghwensis</i>	Domínio catalítico AA10; His6-tag (C-terminal)	Positivo
<i>Salinispora pacifica</i>	Domínio catalítico AA10; His6-tag (C-terminal)	Positivo



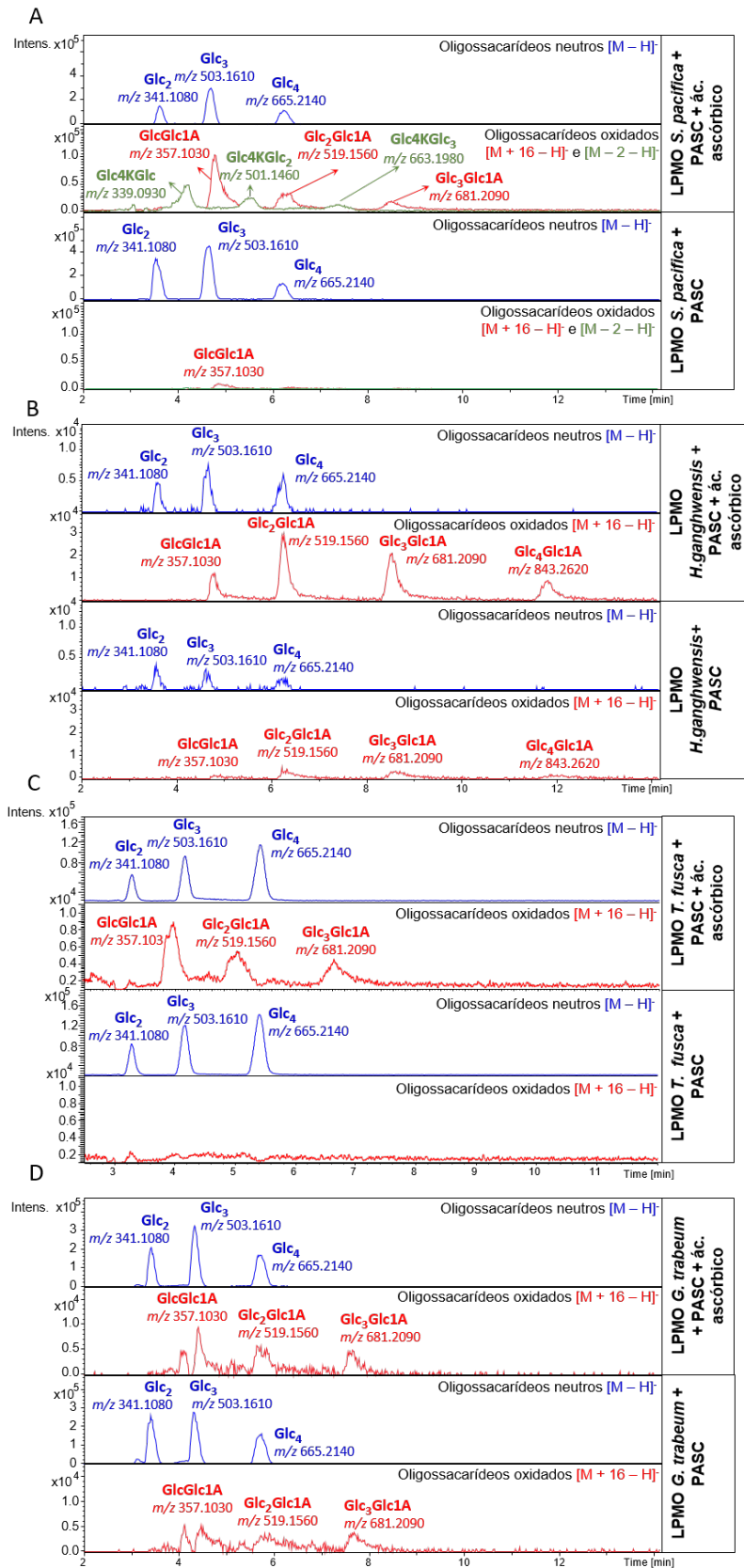
**Figura 2.** Análise por SDS-PAGE, dot-blot e/ou Western blot do sobrenadante de transformantes de *P. pastoris* X-33 produtores de cinco LPMOs bacterianas. *T. fusca*: Exemplo das análises por SDS-PAGE e Western blot de transformantes selecionados. M - Marcador Color Protein Standard Broad Range, NEB. 1 e 3 - Perfil proteico do sobrenadante do cultivo de 48h e de 72h da cepa controle de *P. pastoris* contendo o vetor vazio pPICZαA. 2 e 4 - Sobrenadante do cultivo de 48h e de 72h de *P. pastoris* produtora da LPMO de *T. fusca*. A análise de Western blot correspondente é mostrada seguindo a mesma ordem, sendo que as setas brancas indicam a LPMO recombinante de *T. fusca*. *S. pacifica*: Exemplo das análises por SDS-PAGE e dot-blot de transformantes selecionados. M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Scientific. 1 e 2 - sobrenadantes do cultivo (72h) de dois transformantes de *P. pastoris* produtores da LPMO de *S. pacifica* (domínio catalítico AA10). 3 - controle positivo, correspondente a LPMO recombinante de *T. fusca*; o controle negativo não é mostrado neste gel. Também é mostrada a análise por dot-blot, confirmando a secreção da LPMO recombinante de *S. pacifica* no sobrenadante (72h) de um transformante selecionado, em comparação com o sobrenadante da linhagem controle contendo o vetor vazio pPICZαA e com o controle positivo (LPMO recombinante de *T. fusca*). A membrana de nitrocelulose foi marcada com anticorpo Anti-HisTag conjugado à fosfatase alcalina e a revelação foi feita com substrato NBT/BCIP. *H. ganghwensis*: Exemplo das análises por SDS-PAGE e Western blot de transformantes selecionados produtores do domínio AA10 da LPMO de *H. ganghwensis*. 1 - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific. 2 e 4 - Sobrenadantes do cultivo (72h) de dois transformantes de *P. pastoris* produtores do domínio AA10 da LPMO de *H. ganghwensis*. 3 e 5 - imunodeteção correspondente usando anticorpo contra cauda de poli histidina. 6 e 7 - controle positivo, correspondente a uma xilanase recombinante obtida na Embrapa Agroenergia. *M. dasanensis* / *V. maris*: Exemplo da análise dot-blot do sobrenadante do cultivo (72h) de transformantes de *P. pastoris* produtores dos domínios catalíticos AA10 das LPMOs de *M. dasanensis* (MdAA10.1-SD) e de *V. maris* (VmAA10.2-SD). (+) controle positivo, correspondente a LPMO recombinante de *T. fusca*. pGAP - controle negativo, correspondente ao sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* transformada com o vetor vazio pGAPZαA.

As análises HILIC-UHPLC-ESI-MS confirmaram a capacidade da LPMO recombinante da bactéria *T. fusca* (proteína completa), bem como dos domínios catalíticos AA10 recombinantes das bactérias extremófilas *S. pacifica* e *H. ganghwensis* de despolimerizarem a celulose na presença de ácido ascórbico através de mecanismo oxidativo, uma vez que celo-oligossacarídeos oxidados foram detectados como produtos de ação dessas enzimas (Figura 3). O perfil de produtos catalíticos sugere que o domínio catalítico AA10 da LPMO de *S. pacifica* apresenta regioseletividade C1/C4, uma vez que celo-oligossacarídeos oxidados nas posições C1 (GlcGlc1A – Glc<sub>4</sub>Glc1A) e C4 (Glc4KGlc – Glc4KGlc<sub>3</sub>) foram detectados. O domínio catalítico AA10 da LPMO de *H. ganghwensis*, bem como a LPMO completa de *T. fusca*, por outro lado, liberaram apenas celo-oligossacarídeos C1-oxidados (GlcGlc1A – Glc<sub>4</sub>Glc1A), indicando regioseletividade C1. As diferentes regioseletividades das LPMOs e seus domínios catalíticos podem ser exploradas para diferentes aplicações e ampliam o potencial biotecnológico deste grupo de enzimas.

A LPMO do fungo *G. trabeum* não produziu oligossacarídeos oxidados em níveis superiores aos detectados no controle negativo (na ausência de ácido ascórbico), não sendo possível concluir sobre sua atividade. No caso, somente o domínio AA9 da LPMO de *G. trabeum* foi expresso e uma cauda de poli histidina foi incluída na extremidade C-terminal, modificações que podem interferir na atividade oxidativa sobre a celulose, conforme relatado para algumas LPMOs (Gaber et al., 2020). Apesar disso, conforme Tabela 2, o teste fluorométrico mostrou que o sítio ativo desta proteína está funcional.

A presença de cauda de poli histidina na porção C-terminal da LPMO de *T. fusca* e nos domínios AA10 das LPMOs de *S. pacifica* e *H. ganghwensis*, entretanto, não inviabilizaram a capacidade de despolimerizar a celulose. Além disso, com exceção da LPMO da bactéria *T. fusca*, que foi sintetizada de forma completa, as LPMOs de *S. pacifica* e *H. ganghwensis* foram produzidas somente com o domínio catalítico (AA10), e mesmo assim mostraram-se funcionais pelos métodos utilizados (colorimétrico e espectrométrico). Estes dados corroboram estudos anteriores sobre a funcionalidade de domínios catalíticos de LPMOs produzidos em hospedeiros heterólogos e que tal atividade depende da proteína e de outros fatores (Gaber et al., 2020).

As quatro enzimas testadas liberaram celo-oligossacarídeos neutros (Glc<sub>2</sub> – Glc<sub>4</sub>) independentemente da adição de agente redutor, provavelmente devido à presença de traços de endoglucanases secretadas por *P. pastoris* nas preparações enzimáticas purificadas que foram utilizadas nos testes. Tal hipótese é corroborada pela detecção de atividade de endoglucanase no sobrenadante de *P. pastoris* transformada com os vetores de expressão pGAPZB e pPICZαA vazios (dados não mostrados).



**Figura 3.** Perfil dos produtos de degradação de PASC resultantes da ação das LPMOs pertencentes a (A) *Salinispora pacifica*, (B) *Hahella ganghwensis*, (C) *Thermobifida fusca* e (D) *Gloeophyllum trabeum* na presença ou ausência de ácido ascórbico (agente redutor), obtidos por análises HILIC-UHPLC-ESI-MS. Glc<sub>n</sub> (mostrados em azul) se referem a celo-oligossacarídeos neutros com grau de polimerização igual a n. Glc<sub>n</sub>Glc1A (mostrados em vermelho) se referem a celo-oligossacarídeos oxidados na posição C1 na forma de ácidos aldônicos com grau de polimerização igual a n - 1. Glc<sub>n</sub>Glc1A apresentam valor  $m/z$  M + 16, onde M corresponde à massa molecular de oligossacarídeos neutros com o mesmo grau de polimerização. Glc4KGlC<sub>n</sub> (mostrados em verde) se referem a celo-oligossacarídeos oxidados na posição C4 na forma de 4-cetoaldoses com grau de polimerização igual a n - 1. Glc4KGlC<sub>n</sub> apresentam valor  $m/z$  M - 2, onde M corresponde à massa molecular de oligossacarídeos neutros com o mesmo grau de polimerização. Todos os íons foram detectados na forma desprotonada ([M - H]<sup>-</sup>).



## Conclusões

Das oito LPMOs recombinantes obtidas, cinco foram caracterizadas e mostraram-se funcionais por pelo menos um dos métodos utilizados e três foram capazes de despolimerizar a celulose. Estudos futuros comparando as diferentes formas recombinantes das LPMOs avaliadas no presente trabalho (proteína completa versus domínio catalítico) deverão ser realizados para melhor caracterização da funcionalidade destas enzimas.

A capacidade de despolimerizar a celulose faz desse conjunto de LPMOs recombinantes um ativo tecnológico que poderá ser aplicado como um insumo para o desenvolvimento de produtos ou processos que dependem da despolimerização da celulose. Por exemplo, essa coleção de LPMOs pode ser avaliada para desenvolvimento de coquetéis enzimáticos ou suplementação de tais coquetéis para sacarificação enzimática de biomassas lignocelulósicas. Conforme relatado na literatura científica e patentária, as LPMOs encontram aplicações em diferentes tipos de indústria: de alimentos, nas etapas de processamento na indústria de papel e celulose, nas diferentes etapas de processamento de fibras têxteis e tecidos, como insumos na produção de ração animal, na indústria química baseada em celulose, para produção de nanofibras de celulose a partir de diferentes matérias-primas, entre outras aplicações no conceito de biorrefinarias de materiais lignocelulósicos.

## Referências

FORSBERG, Z., SØRLIE, M., PETROVIĆ, D., COURTADE, G., AACHMANN, F., VAAJE-KOLSTAD, G., BISSARO, B., RØHR, Å. AND EIJSINK, V., 2019. Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monoxygenases. **Current Opinion in Structural Biology**, 59:54-64.

GABER, Y., RASHAD, B., RASHA, H. MAI, A, NOURHAN, A., TAREK, D, VÁRNAI, A., 2020. Heterologous expression of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). **Biotechnology Advances**, 43:107583

ISAKSEN, T., WESTERENG, B., AACHMANN, F.L., AGGER, J.W., KRACHER, D., KITTL, R., LUDWIG, R., HALTRICH, D., EIJSINK, V.G., HORN, S.J., 2014. A C4-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, 289(5):2632-42.

SILVA, C.O.G., TEIXEIRA, T.S., RODRIGUES, K.B., SOUZA, A.A., MONCLARO, A.V., MENDES, T.D., RIBEIRO, J.A.A., SIQUEIRA, F.G., FÁVARO, L.C.L, ABDELNUR, P.V., 2020. Combination of MALDI-TOF MS and UHPLC-ESI-MS for the characterization of lytic polysaccharide monoxygenase activity. **Analytical Methods**, 12(2):149-161.

TANGHE, M., DANNEELS, B., CAMATTARI, A., GLIEDER, A., VANDENBERGHE, I., DEVREESE, B., STALS, I. AND DESMET, T., 2015. Recombinant Expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Pichia pastoris*: Optimizing Yield and N-terminal Processing. **Molecular Biotechnology**, 57(11-12):1010-1017.