

Avaliação da atividade da LPMO Cel61A de *Trichoderma reesei* sobre celulose por espectrometria de massas

Caio de Oliveira Gorgulho Silva¹, Tallyta Santos Teixeira², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Kelly Barreto Rodrigues⁴, Gisele Soares Anastácio⁵, Amanda Araújo Souza⁶, Thais Demarchi Mendes⁷, Thais Fabiana Chan Salum⁸, Léia Cecília de Lima Fávoro⁹, Patrícia Verardi Abdelnur¹⁰

Resumo

Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) são enzimas essenciais para a desconstrução de resíduos lignocelulósicos, uma vez que são capazes de impulsionar a degradação desses materiais por enzimas hidrolíticas tradicionais e diminuir a carga de proteínas necessária. A LPMO Cel61A do fungo modelo *Trichoderma reesei* é capaz de promover a clivagem oxidativa de celulose na presença de agentes redutores, além de apresentar atividade hidrolítica sobre esse polissacarídeo. Por esse motivo, Cel61A apresenta potencial para aplicação em biorrefinarias de lignocelulose. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de Cel61A sobre celulose amorfa (PASC, do inglês *Phosphoric Acid Swollen Cellulose*) em diferentes condições de pH por meio de técnicas analíticas qualitativas avançadas de espectrometria de massas. Cel61A foi produzida de forma heteróloga pela levedura *Komagataella phaffii* (sequência nativa, sem cauda de histidina) em biorreator e purificada por cromatografia de exclusão molecular. Para os testes de atividade enzimática, 6.16 µg de Cel61A foram incubados com PASC (2 mg/mL), ácido ascórbico (1 mM) e tampões acetato de sódio (10 mM) pH 4.5, 5.2 ou 6.0, a 50 °C, sob agitação (1.400 rpm), utilizando volume reacional de 1 mL. Experimentos na ausência de enzima e/ou ácido ascórbico foram realizados como controles negativos. Alíquotas foram recolhidas periodicamente, inativadas a 95 °C, centrifugadas e analisadas por MALDI-TOF MS e UHPLC-ESI-MS. Como resultado da combinação das duas técnicas qualitativas de espectrometria de massas, íons referentes a oligossacarídeos nativos com grau de polimerização (DP) entre 2 e 9 (DP2 – DP9) e oxidados (DP2_{ox} – DP5_{ox}) foram detectados como produtos da ação de Cel61A sobre PASC a partir de 24h de incubação em todas as condições de pH testadas. Oligossacarídeos oxidados foram produzidos por Cel61A apenas quando na presença de ácido ascórbico (agente redutor), confirmando a atividade de LPMO da enzima. A liberação de produtos nativos, entretanto, foi observada independentemente da presença de ácido ascórbico, confirmando a atividade hidrolítica previamente observada por outros autores. As técnicas UHPLC-ESI-MS e MALDI-TOF MS se mostraram complementares para a análise dos produtos de ação de Cel61A. A primeira foi mais eficiente na detecção de diferentes produtos oxidados enquanto a segunda mostrou maior amplitude de detecção para oligossacarídeos nativos. Os resultados confirmam a funcionalidade de Cel61A de *T. reesei* produzida por *K. phaffii* com sequência nativa e sem cauda de histidina, na faixa de pH 4.5 – 6.0, possibilitando sua aplicação em sacarificação de biomassa lignocelulósica.

Auxílio financeiro: Embrapa(SEG 02.12.11.003.00.00).

Palavras-chave: LPMO. *Trichoderma reesei*. *Komagataella phaffii*. celulose. espectrometria de massas.

¹ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, caio.silva@colaborador.embrapa.br.

² Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, doutoranda em Química, Universidade Federal de Goiás, tallyta.santos@colaborador.embrapa.br.

³ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br.

⁴ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, kelly.rodrigues@colaborador.embrapa.br.

⁵ Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, gisele.soares@colaborador.embrapa.br.

⁶ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, amanda.araujo@colaborador.embrapa.br.

⁷ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br.

⁸ Farmacêutica, doutora em Ciências (Bioquímica), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br.

⁹ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br.

¹⁰ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br.