



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RODRIGO RODRIGUES VIRGOLINO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR *IN SILICO*  
DE UMA MONO-OXIGENASE LÍTICA DE  
POLISSACARÍDEO CIANOBACTERIANA**

**BELÉM - PARÁ**

**2024**

**RODRIGO RODRIGUES VIRGOLINO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR *IN SILICO*  
DE UMA MONO-OXIGENASE LÍTICA DE  
POLISSACARÍDEO CIANOBACTERIANA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

**ORIENTADOR:**

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves

**BELÉM - PARÁ**

**2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

- V816c Virgolino, Rodrigo.  
Caracterização molecular in silico de uma mono-oxigenase  
lítica de polissacarídeo cianobacteriana / Rodrigo Virgolino. —  
2024.  
81 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Evonnildo Gonçalves  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de  
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Biodiversidade e Biotecnologia, Belém, 2024.
1. Mastigocoleus testarum. 2. Mono-oxigenases líticas de  
polissacarídeos. 3. Despolimerização de quitina. 4. Simulação  
de dinâmica molecular. I. Título.

CDD 660.6

---

RODRIGO RODRIGUES VIRGOLINO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR *IN SILICO*  
DE UMA MONO-OXIGENASE LÍTICA DE  
POLISSACARÍDEO CIANOBACTERIANA**

**Data da apresentação: 13/03/2024**

**Belém (PA)**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves**

(UFPA – Orientador)

---

**Profa. Dra. Juliana Silva Cassoli**

(UFPA – Membro Interno)

---

**Profa. Dra. Luciana Pereira Xavier**

(UFPA – Membro Interno)

---

**Prof. Dr. Luis Adriano Nascimento**

(UFPA – Membro Interno)

---

**Prof. Dr. Ronaldo Correia da Silva**

(UFPA – Membro Externo)

## **AGRADECIMENTOS**

O autor agradece ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento desta pesquisa, bem como aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Biomolecular que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa pesquisa.

**EPÍGRAFE:** "O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano." – Isaac Newton.

## RESUMO

As mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, do inglês *Lytic polysaccharide monoxygenases*) são enzimas dependentes de cobre que catalisam a clivagem oxidativa de ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  e têm despertado grande atenção por se mostrarem importantes em aumentar a eficiência da degradação de substratos poliméricos recalcitrantes, em sinergismo com a ação de enzimas hidrolíticas, como uma função acessória. No entanto, as LPMOs atuam via clivagem oxidativa ao invés de hidrólise. Em aplicações industriais, LPMOs de origem fúngica são as mais frequentes, enquanto outros grupos taxonômicos têm sido descritos como possíveis fontes alternativas destas enzimas. No presente estudo, objetivou-se identificar e caracterizar *in silico* uma LPMO de origem cianobacteriana com funções putativas na despolimerização de quitina. A busca por similaridade de sequências e conservação de domínios com outras LPMOs já caracterizadas identificou uma proteína de 289 AAs da cianobactéria *Mastigocoleus testarum* da Ordem Nostocales, sendo uma provável LPMO da classe CAZy-AA10. Esta proteína é referida como MtLPMO10. A análise filogenética revelou que a MtLPMO10 é homóloga à proteína Tma12 da samambaia *Tectaria macrodonta*, com 52,11% de identidade, a qual foi a primeira LPMO caracterizada como proveniente do reino vegetal. A ocorrência de padrões estruturais e funcionais compartilhados com outras LPMOs da classe AA10, bem como a existência de variações nesses padrões estabelecidos, contribui para o entendimento das funções biológicas dessa classe de enzimas. A disposição terciária proteica predita pelo servidor AlphaFold apontou características estruturais comuns às LPMOs, em especial uma braçadeira de histidinas compostas pela His31 e His132 e um domínio similar à imunoglobulina composto de fitas beta antiparalelas. A simulação de dinâmica molecular (DM) permitiu avaliar a afinidade entre enzima e prováveis substratos, utilizando uma pose inicial baseada em dados obtidos da literatura. Houve estabilidade do complexo MtLPMO10-quitina durante 100ns de DM, enquanto o complexo MtLPMO10-celulose desfez-se em 30ns de DM. Também, houve uma menor distância Cu(I)-H4 no primeiro complexo, comparada à distância Cu(I)-H1 (médias  $6,0 \pm 0,7 \text{ \AA}$  e  $7,9 \pm 0,7 \text{ \AA}$ , respectivamente), sugerindo uma regioseletividade do tipo C4, como definido para a Tma12. Este estudo destaca a existência de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos em cianobactérias, e abre caminho para novas investigações relacionadas a esta classe enigmática de enzimas e seu potencial uso em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Cianobactérias. LPMO de *Mastigocoleus testarum*. Despolimerização de quitina. Simulação de dinâmica molecular.

## ABSTRACT

Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) are copper-dependent enzymes that catalyze the oxidative cleavage of  $\beta(1-4)$  glycosidic bonds and have attracted great attention due to importance in increasing the efficiency in degradation of recalcitrant polymeric substrates, in synergism with the action of hydrolytic enzymes, as an accessory function. However, LPMOs act via oxidative cleavage rather than hydrolysis. In industrial applications, LPMOs of fungal origin are the most frequent, while other taxonomic groups have been described as possible alternative sources of these enzymes. In the present study, we aimed to identify and characterize *in silico* a LPMO of cyanobacterial origin with putative functions in chitin depolymerization. The search for sequence similarity and conservation of domains with other characterized LPMOs identified a 289 AA protein from the cyanobacterium *Mastigocoleus testarum* of the Nostocales Order, being a probable LPMO of the CAZy-AA10 class. This protein is referred to as MtLPMO10. Phylogenetic analysis revealed that MtLPMO10 is homologous to the Tma12 protein from the fern *Tectaria macrodonta*, with 52.11% identity, which was the first LPMO characterized as originating from the plant kingdom. The occurrence of shared structural and functional patterns with other AA10 class LPMOs, as well as the existence of variations in these established patterns, contributed to the understanding of the biological functions of this class of enzymes. The predicted protein tertiary arrangement by the AlphaFold server pointed out structural features common to LPMOs, especially a histidine brace composed of His31 and His132 and an immunoglobulin-like domain consisting of antiparallel beta strands. Molecular dynamics simulation (MD) allowed evaluating the enzyme-substrate affinity, using an initial pose based on data obtained from the literature. There was stability of the MtLPMO10-chitoheptaose complex during 100ns of MD, while the MtLPMO10-celloheptaose complex broke apart in 30ns of MD. Also, there was a shorter Cu(I)-H4 distance in the first complex compared to the Cu(I)-H1 distance (averages  $6.0 \pm 0.7 \text{ \AA}$  and  $7.9 \pm 0.7 \text{ \AA}$ , respectively), suggesting a C4-type regioselectivity, as defined for Tma12. This study highlights the existence of lytic polysaccharide monooxygenases in cyanobacteria and paves the way for further investigations related to this enigmatic class of enzymes and their potential use in biotechnological applications.

Keywords: Cyanobacteria. LPMO from *Mastigocoleus testarum*. Chitin depolymerization. Molecular dynamics simulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo e principais achados relacionados às LPMOs. Fonte: Vandhana et al. (2022).....	4
Figura 2: Estrutura das LPMOs e seu centro catalítico. a) Superfície plana estendida (porção inferior da figura) onde localiza-se o centro catalítico da enzima, o qual é composto pelo núcleo de Cu (esfera vermelha) coordenado pela braçadeira de histidina. Os resíduos são representados como bastão. Fonte: Wang et al. (2021). b) Visão do núcleo catalítico com o átomo de Cu oxidado, coordenado por duas histidinas e uma tirosina, da proteína LsLPMO9A (do fungo <i>Lentinus similis</i> , PDB 5ACG). Fonte: Vaaje-Kolstad et al. (2017).....	6
Figura 3: Fórmula estrutural da braçadeira de histidina em LPMOs das famílias AA9 (esquerda) e AA10 (direita). Fonte: Wang et al. (2021).....	7
Figura 4: Alinhamento de sequências de LPMOs da família AA9A dos tipos C1 e/ou C4, com base em estruturas. Em fundo escuro estão resíduos completamente conservados, fundo magenta indica >75% dos resíduos conservados, fundo azul indica >50% dos resíduos conservados. Fonte: Long et al. (2022).....	9
Figura 5: Oxidação do carbono C1 na celulose. No topo da imagem são exibidas as cadeias celulósicas (em verde). A LPMO com atividade em C1 oxida (“x” em vermelho indica oxidação) e cliva o substrato em fragmentos grandes (verdes) e pequenos (vermelhos), porém, apenas os fragmentos pequenos são solúveis. O número de fragmentos pequenos aumenta se são utilizados coquetéis enzimáticos. Fonte: Adaptado de Westereng et al. (2013). .....	11
Figura 6: Produtos da clivagem da ligação glicosídica em celulose, conforme regioespecificidade para o carbono C1 ou C4. A preferência por C1 gera lactonas, que convertem para ácido aldônico, e a preferência por C4 gera cetonas, que convertem para gemdiols. Fonte: Vaaje-Kolstad et al. (2017).....	12
Figura 7: Domínios e estrutura da LPMO putativa. ....	21
Figura 8: Árvore filogenética dos módulos catalíticos caracterizados na família de enzimas AA10. A estrela indica o módulo catalítico da proteína cianobacteriana. As sequências catalíticas foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE e submetidas ao programa RAxML em 400 iterações de <i>bootstrap</i> seguidas de análise de máxima verossimilhança para escolha da melhor solução. Entre parênteses está a região de preferência. A linha pontilhada indica	

um cluster de enzimas com afinidade por quitina no carbono C1. Os diamantes coloridos indicam a afinidade a substratos caracterizada para cada enzima, exceto para a cor verde, que indica o grupo externo da família AA9. ND: não definido. .... 23

Figura 9: Alinhamento das sequências de maior identidade com a MtLPMO10 e que possuem estrutura experimentalmente determinada no PDB. O alinhamento múltiplo de sequências inclui a MtLPMO10, Tma12 (PDB ID: 6IF7), CbpD (8C5N) e ScLPMO10D (7ZJB). A SmLPMO10A (PDB ID: 2BEM) é adicionada para referência. As estruturas proteicas secundárias são exibidas acima das sequências. As setas rosas indicam as histidinas da braçadeira que coordenam o centro metálico e a fenilalanina da esfera de coordenação secundária. As bolas vermelhas indicam dez resíduos com maior afinidade pela quitina após a dinâmica molecular com a MtLPMO10, mais a His31 na seta rosa e a His73 na estrela vermelha. Em fundo verde são marcados os resíduos com distância até 5 Å do cobre na Tma12, e seus respectivos homólogos. Em letras laranja são marcados os resíduos do padrão “TAXH” de reconhecimento de quitina. A estrela azul marca o triptofano conservado do padrão “WWW” e as bolas azuis marcam os outros dois resíduos desse padrão. As estrelas vermelhas marcam o par de reconhecimento de quitina Gln-Thr. As estrelas verdes marcam o par de acesso ao túnel controlador de acesso ao centro catalítico. O fundo amarelo indica o consenso “Y(W)EPQSVE”. Os resíduos são numerados conforme o respectivo registro no PDB. .... 29

Figura 10: Visão geral do modelo putativo tridimensional da MtLPMO10. O modelo é colorido segundo suas estruturas secundárias: alfa hélices em ciano, fitas-beta em rosa e loops em laranja. Em vermelho é exibido o cobre do centro catalítico, posicionado segundo as coordenadas tridimensionais na Tma12 após alinhamento estrutural com a MtLPMO10. A seta preta indica a primeira histidina da proteína funcional, que participa da coordenação do centro de cobre. As setas verdes delimitam o longo loop existente entre a primeira e a segunda fitas-beta. A seta azul indica três regiões de loop na superfície próxima ao centro de cobre. .... 34

Figura 11: Padrão de conservação de resíduos da MtLPMO10. Em laranja são exibidos os resíduos altamente conservados com base no alinhamento múltiplo de sequências com outras 487 sequências que compartilham 40% ou mais de identidade com a MtLPMO10, resultado de busca no BLASTp-RefSeq. Em vermelho é exibido o cobre do centro catalítico,

posicionado segundo as coordenadas tridimensionais do PDB 6IF7 após alinhamento estrutural com a MtLPMO10. As histidinas da braçadeira são exibidas em bastão..... 36

Figura 12: Sobreposição estrutural da MtLPMO10 com as três estruturas encontradas com maior identidade de sequências. A) Modelo putativo da MtLPMO10 (em vermelho é exibido o cobre do centro catalítico, posicionado segundo as coordenadas tridimensionais da Tma12). B) Em cinza é exibida a estrutura tridimensional da Tma12 (PDB ID 6IF7), alinhada com a MtLPMO10 com RMSD = 0,728. C) Em cinza é exibida a estrutura tridimensional do CbpD (8C5N), alinhada com a MtLPMO10 com RMSD = 1,010. D) Em cinza é exibida a estrutura tridimensional da ScLPMO10D (7ZJB), alinhada com a MtLPMO10 com RMSD = 0,787. .... 36

Figura 13: Sítio de ligação ao cobre na MtLPMO10. Em verde são exibidos os resíduos a 5 Å de distância do centro catalítico da MtLPMO10 (em verde) e da Tma12 (em laranja). O cobre da Tma12 é exibido como esfera. As linhas amarelas indicam a distância do centro metálico para os três nitrogênios da braçadeira de histidina da Tma12. A Ala129, vizinha à Thr130 na MtLPMO10, embora mais afastada do cobre, é exibida para referência, em bastões brancos..... 37

Figura 14: Visão das distâncias entre o Cu(I), o hidrogênio H1 (ligado ao carbono C1 da ligação glicosídica) e o hidrogênio H4 (ligado ao carbono C4) após 100 ns de dinâmica molecular. .... 39

Figura 15: Distâncias, no decorrer de 100 ns de simulação de DM da MtLPMO10 com quitina, entre o Cu(I), o hidrogênio H1 mais próximo (ligado ao carbono C1 da ligação glicosídica) e o hidrogênio H4 (ligado ao carbono C4). Cada gráfico representa uma réplica do experimento. .... 40

Figura 16: Distâncias, no decorrer de 100 ns de simulação de DM da SmAA10A com quitohexaose, entre o Cu(I), o hidrogênio H1 mais próximo (ligado ao carbono C1 da ligação glicosídica) e o hidrogênio H4 (ligado ao carbono C4)..... 41

Figura 17: Distâncias médias quadráticas (RMSD) da proteína (MtLPMO10) e do ligante (quitina) no decorrer de 100 ns de simulação. Cada gráfico representa uma réplica do experimento. .... 42

Figura 18: Distâncias médias quadráticas (RMSD) da proteína (SmAA10A) e do ligante (quitohexaose) no decorrer de 100 ns de simulação..... 43

Figura 19: RMSF da MtLPMO10 no decorrer de 100 ns de simulação. Cada gráfico representa uma réplica do experimento. ....	44
Figura 20: Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 15 resíduos de aminoácidos que mais contribuiram com a interação ao ligante em 100 ns de DM. L2: resíduos do loop L2. Bolas verdes: resíduos a uma distância de até 5 Å do cobre. Bolas laranja: resíduos do padrão “TAXH”. Bola vermelha: resíduo que participa do par de reconhecimento de quitina. Bolas amarelas: resíduos da sequência consenso “Y(W)EPQSVE”. Bolas azuis: resíduos 100% conservados entre 487 sequências similares (Figura 11). ....	45
Figura 21: Disposição tridimensional dos 15 principais resíduos em interação com o ligante, obtidos pela decomposição de energias (MM/PBSA). A superfície da MtLPMO10 é exibida em branco, ao fundo, com a região L2 colorida em amarelo. As histidinas da braçadeira são exibidas em rosa. O ligante é mostrado em linhas pretas e os seus monômeros são numerados em subsítios a partir do local provável de quebra da ligação glicosídica (marcado como estrela amarela), de -4 a +4, com números positivos em direção ao terminal redutor e negativos em direção ao terminal não redutor do ligante, como praticado no estudo de hidrolases (SUNNA et al., 1997; BISSARO et al., 2018). O cobre é representado como esfera metálica. ....	46
Figura 22: Disposição tridimensional dos resíduos chaves na interação com o substrato. Em amarelo são exibidos os resíduos de interesse. Estes foram identificados com base em estudos de mutagênese, computacionais e Ressonância Nuclear Magnética sobre a SmAA10A, com a sobreposição estrutural das enzimas para identificar os respectivos homólogos. A) MtLPMO10, onde são também exibidos outros resíduos importantes na DM neste estudo, em cor verde. B) Tma12 (PDB ID 6IF7). C) CbpD (PDB 8C5N), em azul à esquerda está o Glu45, que estende a superfície de ligação à quitina. D) ScLPMO10D (PDB 7ZJB). E) SmAA10A (PDB 2BEM). ....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas cujas sequências compartilham ao menos 40% de identidade com a sequência de aminoácidos da MtLPMO10.....	27
Tabela 2: Avaliação da qualidade de modelos tridimensionais da MtLPMO10 obtidos. Modeller single utiliza um alinhamento com único <i>template</i> para modelagem por homologia. Modeller Multiple utiliza alinhamento com múltiplos <i>templates</i> para tentar melhorar a qualidade final do modelo obtido. ....	32
Tabela 3: Cálculos de energia livre pelos métodos MM/PBSA e MM/GBSA nos sistemas finalizados na DM. ....	50

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CAZy – *Carbohydrate-Active enZymes Database*

CBP – *Carbohydrate-Binding Protein*

CDD – *Conserved Domain Database*

DM – Dinâmica Molecular

KBBE – *Knowledge-Based Bioeconomy*

LPMO – *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*

MALDI-TOF-MS – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight - Mass Spectrometry*

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

RESP – *Restrained Electrostatic Potential*

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Hipótese .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Objetivo geral .....	2
1.2.2	Objetivos específicos .....	2
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Histórico .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Fundamentos das LPMOs .....</b>	<b>4</b>
2.2.1	Definição e características de LPMOs.....	4
2.2.2	Estrutura.....	5
<b>2.3</b>	<b>Importância e mecanismos de ação enzimática das LPMOs.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4</b>	<b>As cianobactérias no contexto da bioeconomia.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda global por energia renovável tem aumentado devido às preocupações com o esgotamento dos combustíveis fósseis e as emissões de gases de efeito estufa. A natureza finita dos combustíveis fósseis vem se impondo como um fator limitante à sustentabilidade, à economia e ao progresso mundial, levando inclusive a crises energéticas e guerras entre países. Estima-se que o uso de combustíveis fósseis elevou os níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico de 300 ppm para 400 ppm no último século. Com o aumento na produção de gases de efeito estufa, as mudanças climáticas resultantes do aumento na temperatura atmosférica média levam ao derretimento das massas polares, elevação no nível dos oceanos, submersão de regiões densamente povoadas e aumento das regiões desérticas. Este cenário aponta à necessidade de buscar formas alternativas de energia para atender à demanda crescente, evidenciando-se os biocombustíveis como uma alternativa atraente aos combustíveis fósseis, pois são derivados de fontes renováveis e podem reduzir significativamente as emissões de gases de efeito estufa.

No entanto, a produção em larga escala ainda enfrenta alguns desafios em termos de eficiência e custo, principalmente relacionados à característica recalcitrante de biomateriais como a quitina e o material lignocelulósico, que os tornam resistente à despolimerização e necessitam do emprego de métodos físicos e enzimáticos para conversão de biomassa em monossacarídeos e posterior utilização como matéria prima para produção de biocombustíveis ou no processamento de biomateriais. Nesse contexto, as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, do inglês *Lytic polysaccharide monooxygenases*) têm sido extensivamente estudadas na última década devido à sua comprovada ação em sinergismo com outras enzimas degradadoras de carboidratos, o que certifica a completa despolimerização de polissacarídeos recalcitrantes, com uma ampla gama de aplicações industriais.

Inicialmente identificadas como pertencentes à família CAZy *Carbohydrate-Binding Module 33* (CBM33, uma família de proteínas sem ação catalítica) ou à família CAZy *Glycoside Hydrolase 61* (GH61), as LPMOs são hoje classificadas como enzimas de Atividades Auxiliares ou (AA, do inglês *Auxiliary Activity*), sendo que as famílias maiores e mais bem estudadas são a AA9, composta exclusivamente de fungos, e a AA10, composta majoritariamente de bactérias e alguns membros fúngicos e virais. Por outro lado, recentemente, LPMOs de outros grupos taxonômicos têm sido reportadas, a exemplo de uma LPMO encontrada no proteoma digestivo do inseto *Thermobia domestica* (SABBADIN et al., 2018) classificada como uma nova família AA15,

e a proteína Tma12 da samambaia *Tectaria macrodonta*, uma LPMO com atividade em quitina e ação inseticida, classificada na família AA10 (YADAV et al., 2019), sendo a primeira LPMO identificada em plantas.

Aqui, é identificada uma provável LPMO da família AA10 de 289 aminoácidos encontrada no proteoma da cianobactéria *Mastigocoleus testarum* BC008 da Ordem Nostocales. Esta é a primeira identificação de uma LPMO no Filo Cyanobacteriota.

## 1.1 Hipótese

Cianobactérias apresentam potencial para produção de LPMOs que possam ser utilizadas em coquetéis enzimáticos industriais para degradação de biomateriais.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

Prospectar e caracterizar a estrutura e função, *in silico*, de LPMOs produzidas por cianobactérias.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Descrever a diversidade de LPMOs em diferentes grupos taxonômicos de cianobactérias utilizando bancos de dados públicos;
- Estabelecer a relação filogenética entre as LPMOs de diferentes grupos taxonômicos;
- Realizar análise comparativa com base em sequências e/ou estruturas proteicas de LPMOs cianobacterianas com relação a LPMOs de outros grupos taxonômicos, já caracterizadas ou utilizadas comercialmente na degradação de carboidratos;
- Determinar o comportamento de LPMOs cianobacterianas em relação ao substrato em solução, com base em técnicas de dinâmica molecular *in silico*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

As LPMOs são uma classe relativamente nova de enzimas que foram estabelecidas formalmente em 2010, quando Vaaje-Kolstad et al. (2010) demonstraram que a proteína já conhecida CBP21, até então tida como não catalítica, na verdade tinha a capacidade de clivar ligações glicosídicas em  $\beta$ -quitina por meio de uma reação redox. Estes autores conseguiram provar, por meio do uso de moléculas de dióxigênio marcadas radioativamente, que um átomo de oxigênio era inserido na cadeia do carboidrato na presença de um agente redutor, sendo este o marco que definiu as LPMOs como um grupo diferente das enzimas hidrolíticas até então conhecidas na despolimerização de carboidratos. Porém, o caminho até 2010 iniciou bem antes, ainda em 1954, quando Reese & Gilliga (1954) hipotetizaram a existência de um fator proteico não hidrolítico (chamado “fator C”) capaz de romper partes cristalinas da celulose e torna-la mais tratável pelas celulasas.

Eriksson et al. (1974) mostraram que o oxigênio era importante na conversão de celulose a partir do fungo *Sporotrichum pulverulentum*, e que uma atividade oxidativa poderia estar envolvida neste processo. Nos anos entre 1990 e 2000, cientistas trabalhando com bactérias do solo observaram a liberação de uma proteína ainda não definida na época, que tinha alta afinidade por quitina, e a classificaram como *Carbohydrate-Binding Protein* (CBP) (SCHNELLMANN et al., 1994; SUZUKI et al., 1998), e em 1998, uma molécula ortóloga de 21-kDa foi encontrada na bactéria *Serratia marcescens* (SUZUKI et al., 1998) e chamada CBP21. Esta proteína foi classificada como uma família CBM33. Já em 2005, foi determinada a estrutura tridimensional da CBP21 (VAAJE-KOLSTAD et al., 2005), quando se demonstrou pouca semelhança com a estrutura das CBMs até então conhecidas. Esses estudos formaram a base para a definição da nova classe de enzimas, as LPMOs. A Figura 1 detalha os principais achados históricos relacionados às LPMOs, revisados em Vandhana et al. (2022).

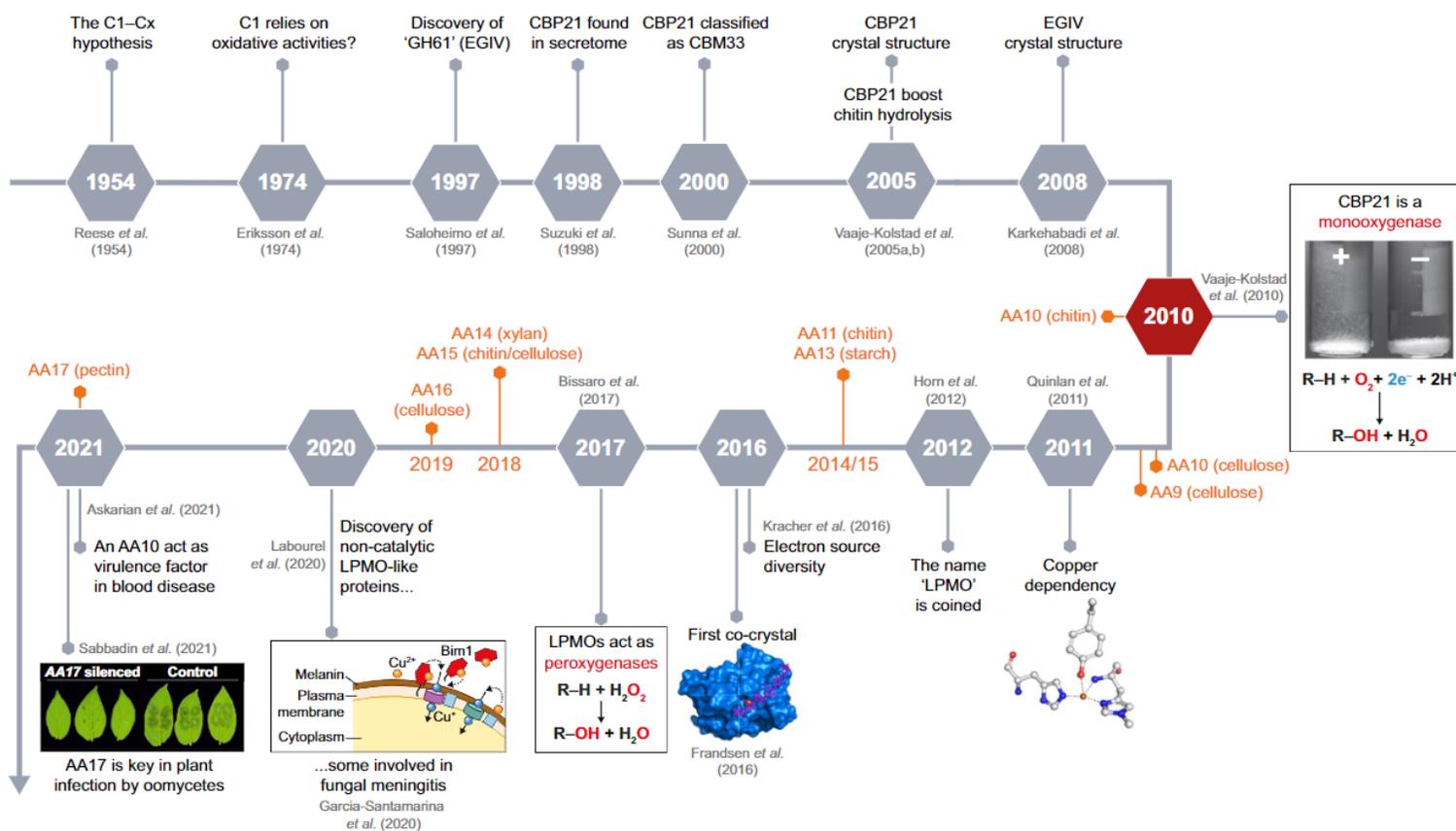


Figura 1: Linha do tempo e principais achados relacionados às LPMOs. Fonte: Vandhana *et al.* (2022).

De forma geral, a descoberta das LPMOs foi um marco importante na compreensão da degradação microbiana da biomassa, pois elas são capazes de degradar de forma eficiente a celulose e outros polissacarídeos estruturais que não podem ser degradados eficientemente apenas usando enzimas celulolíticas clássicas.

## 2.2 Fundamentos das LPMOs

### 2.2.1 Definição e características de LPMOs

As monoxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre surgiram como alternativa à degradação de carboidratos lignocelulósicos recalcitrantes na indústria: enquanto a desconstrução da parede celular era vista como basicamente uma reação de hidrólise enzimática necessitando apenas de água para sua efetivação, a caracterização da ação das recém descobertas LPMOs mostrou que este processo pode ser mais complexo do que o pensado, com a necessidade

de um doador externo de elétrons e um cosubstrato, porém, pode ser mais eficiente uma vez que o uso de LPMOs causa um afrouxamento na estrutura da biomassa, facilitando a ação posterior das hidrolases.

Atualmente, as LPMOs classificam-se nas famílias de enzimas de Atividade Auxiliar no CAZy: AA9, AA10, AA11, AA13, AA14, AA15, AA16 e AA17. As maiores e mais bem estudadas famílias são a AA9, caracterizada por englobar exclusivamente LMPOs de origem fúngica (juntamente às famílias AA11 e AA13) e a AA10, que possui principalmente LPMOs bacterianas, fúngicas e virais.

### 2.2.2 Estrutura

As LPMOs são caracterizadas por um domínio catalítico com um centro ativo que contém um átomo de cobre (Cu), o qual é responsável por catalisar a oxidação dos açúcares no seu substrato, e está posicionado em uma estrutura plana similar à imunoglobulina/fibronectina III, formada por 7 a 9 fitas  $\beta$  no centro da proteína (Figura 2A). Esta planicidade auxilia a interação das LPMOs com superfícies planas, comuns em substratos cristalinos como celulose e quitina, embora tenha-se demonstrado também a ação das enzimas em substratos em solução. O domínio catalítico, o qual possui o centro de cobre é frequentemente conectado a um ou mais domínios acessórios que têm papel na ligação e reconhecimento do substrato.

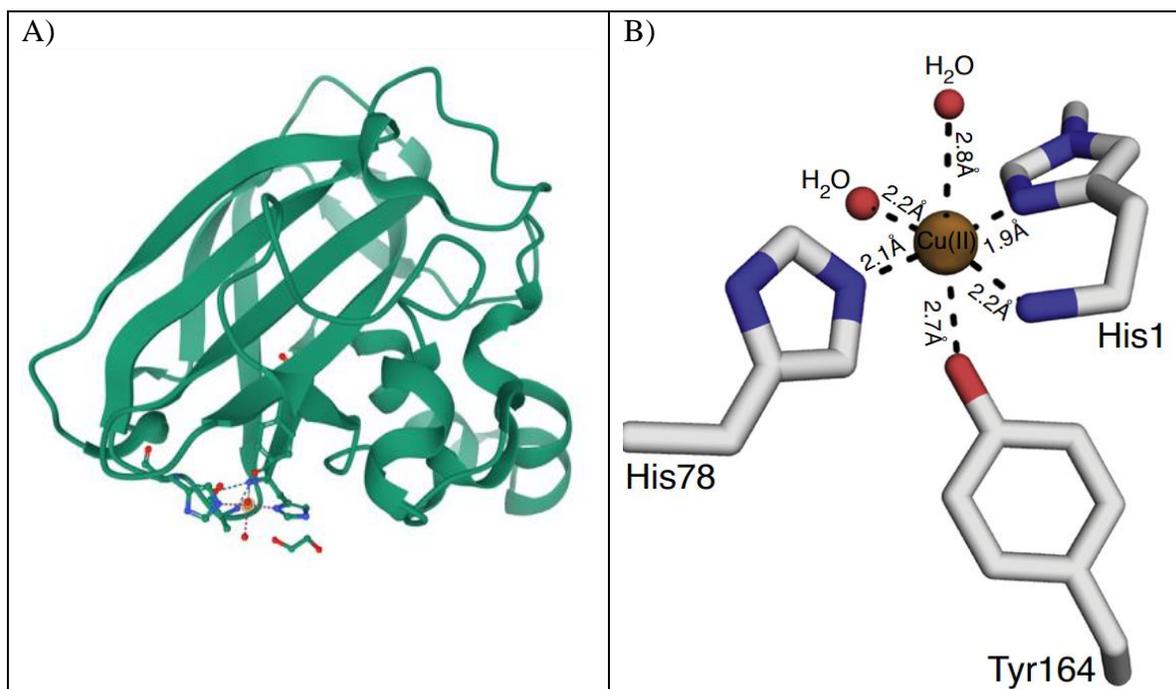


Figura 2: Estrutura das LPMOs e seu centro catalítico. a) Superfície plana estendida (porção inferior da figura) onde localiza-se o centro catalítico da enzima, o qual é composto pelo núcleo de Cu (esfera vermelha) coordenado pela braçadeira de histidina. Os resíduos são representados como bastão. Fonte: Wang et al. (2021). b) Visão do núcleo catalítico com o átomo de Cu oxidado, coordenado por duas histidinas e uma tirosina, da proteína LsLPMO9A (do fungo *Lentinus similis*, PDB 5ACG). Fonte: Vaaje-Kolstad et al. (2017).

O átomo de cobre do centro catalítico é coordenado por resíduos de histidina (Figura 2B) altamente conservados, estrutura essa geralmente referida como “braçadeira de histidina” (QUINLAN et al., 2011), sendo que uma das histidinas está presente na terminação amino da enzima (histidina H1) e, em fungos, sofreu modificação pós-traducional via metilação. Essa metilação não ocorre em LPMOs de bactérias (Figura 3). Além das histidinas, o centro catalítico das LPMOs também possui outros resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica, incluindo uma base de ácido aspártico que estabiliza o íon de cobre e uma base de ácido glutâmico que interage com o oxigênio molecular e está envolvida na regulação da reatividade do íon de cobre. A estrutura do centro catalítico é altamente conservada entre as diferentes famílias de LPMOs, embora a natureza exata dos resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica

possa variar entre as diferentes famílias. Estudos recentes têm investigado a estrutura e a função dos centros catalíticos das LPMOs com o objetivo de entender melhor como essas enzimas podem ser usadas para quebrar a lignocelulose e outros substratos complexos, e têm mostrado tanto uma maior diversidade de grupos taxonômicos que expressam estas proteínas quanto uma maior gama de aplicações no processamento de polissacarídeos (IPSEN et al., 2021).

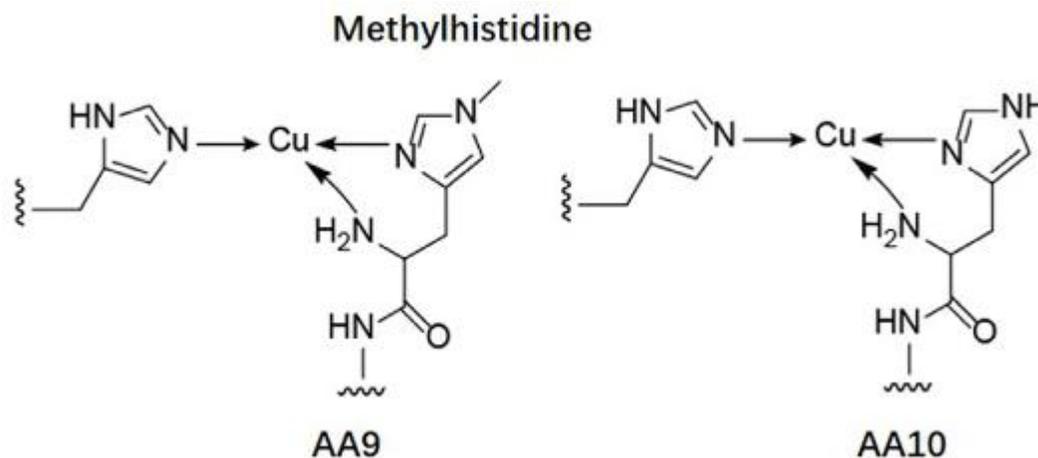


Figura 3: Fórmula estrutural da braçadeira de histidina em LPMOs das famílias AA9 (esquerda) e AA10 (direita). Fonte: Wang et al. (2021).

As enzimas LPMOs podem ser classificadas em dois grupos principais com base na estrutura do seu domínio catalítico e na posição do carbono que é oxidado na ligação glicosídica do substrato: LPMOs tipo C1 e LPMOs tipo C4. Nas LPMOs C1, o carbono primário (C1) do carboidrato é oxidado, enquanto nas LPMOs C4, o carbono secundário (C4) é oxidado. Além disso, estudos estruturais indicam que as LPMOs C1 e C4 têm diferentes conformações e mecanismos de oxidação, sendo que as LPMOs C1 geralmente possuem um túnel de acesso mais amplo que permite a entrada da celulose, enquanto as LPMOs C4 possuem um túnel de acesso menor. Isso pode refletir diferenças em como as enzimas interagem com o substrato e onde elas podem acessar a molécula para realizar a oxidação (FRANDSEN; LO LEGGIO, 2016; VAAJE-KOLSTAD et al., 2017; ARORA et al., 2019; FORSBERG et al., 2019).

Outra característica estrutural de várias LPMOs é a existência de módulos de ligação a carboidratos, que são domínios proteicos com estrutura compacta envolvidos no direcionamento do centro catalítico da enzima para o substrato alvo. Muitas LPMOs possuem um domínio da

família CBM1 presente na sua porção C-terminal. Como seria previsto, a deleção experimental do CBM1, por meio de engenharia de proteínas, causa enfraquecimento ou mesmo perda da capacidade de ligação da enzima ao substrato cristalino, prejudicando a sua atividade catalítica.

Interessantemente, porém, como demonstrado por Chalak et al. (2019), ao estudar a interação da PaLPMO9H de *Podospora anserina* com modelos de substrato celulósico, essa atividade positiva do CBM1 para a interação enzima-substrato parece ser importante apenas quando há baixa concentração de substrato. Conforme aumentou a concentração experimental do substrato celulósico, a PaLPMO9H truncada para o CBM1 gerou mais açúcares oxidados que a enzima completa, se a concentração do substrato foi além da saturação. Logo, é possível que o CBM1 na porção C-terminal determine uma afinidade benéfica em relação ao substrato, mas aumente a probabilidade de ligações não-produtivas conforme aumenta a concentração do substrato. Outro efeito observado pelos autores foi a alteração na regioseletividade da enzima: a enzima completa possui atividade C4, enquanto a enzima truncada aumentou significativamente a clivagem na região C1. Uma possível explicação a isso foi uma leve alteração na posição da enzima em relação ao substrato devido à ausência da CBM1, o que alterou a distância entre o carbono C1 e o centro de cobre, assim alterando a regioseletividade da PaLPMO9H.

Apesar da existência de CBMs, a interação enzima/substrato é multiponto, com *loops* presentes na superfície plana cujos resíduos de aminoácidos interagem com o substrato de forma ampla, mesmo longe do centro de cobre. Por exemplo, utilizando simulação *in silico* via dinâmica molecular da interação entre a enzima HiLPMO9B do fungo *Heterobasidion irregulare* e fibras de celulose, Liu et al. (2018) sugeriram resíduos importantes na interação com o substrato, presentes nos *loops* L2 (Tyr20) e LC (Asp205, Tyr207, Glu210), além de que a Asp205 e Glu210 estavam envolvidos na ligação direta ou por intermédio de uma molécula de H<sub>2</sub>O com a hidroxila do carbono C6 na glucose, bem como sugeriu a preferência do sítio ativo em se orientar em direção ao carbono C1 da ligação glicosídica, refletindo a regioseletividade da enzima.

Outra característica marcante das LPMOs é sua considerável variabilidade de sequências nas regiões de *loop*, o que reflete na especificidade ampla para diferentes substratos nas diferentes LPMOs. Por exemplo, na Figura 4, observa-se o alinhamento de LPMOs da família AA9 com diferentes regioseletividades. A LsLPMO9A possui atividade sobre celo-oligossacarídeos e os resíduos Asn28, His66 e Asn67 têm sido mostrados importantes na ligação a esse substrato, enquanto NcLPMO9C e NcLPMO9D que também possuem atividade sobre celo-oligossacarídeos,

possuem Asn conservadas equivalentes à Asn28 de LsLPMO9A, a NcLPMO9C possui uma His64 conservada em relação à LsLPMO9A. Porém, a TaLPMO9A, que não possui atividade em celoligosacarídeos, não possui nenhum desses três resíduos conservados.

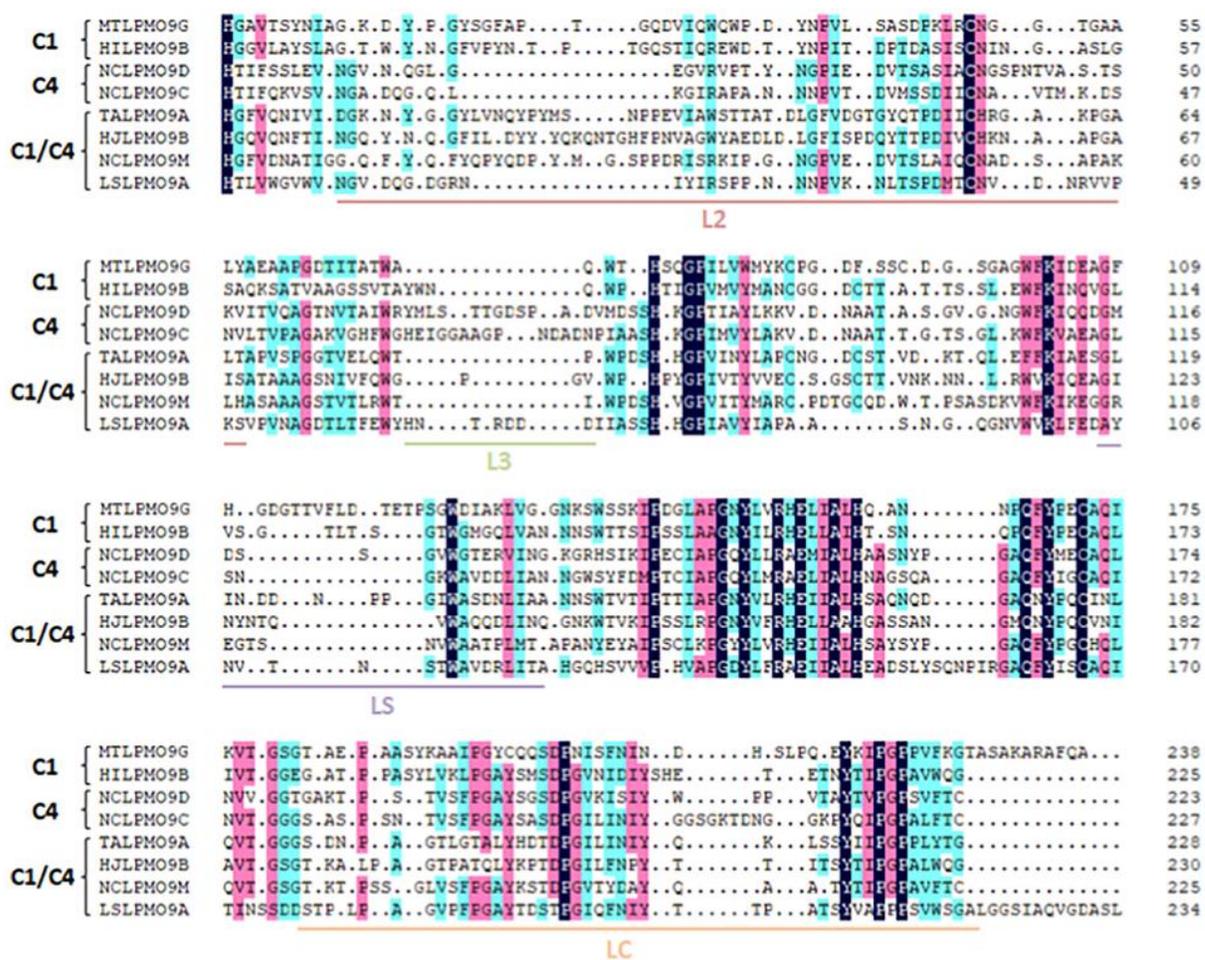


Figura 4: Alinhamento de sequências de LPMOs da família AA9A dos tipos C1 e/ou C4, com base em estruturas. Em fundo escuro estão resíduos completamente conservados, fundo magenta indica >75% dos resíduos conservados, fundo azul indica >50% dos resíduos conservados. Fonte: Long et al. (2022).

### 2.3 Importância e mecanismos de ação enzimática das LPMOs

As enzimas visam aumentar a velocidade com que o equilíbrio de reação da transformação de substrato em produto é alcançado. A cinética enzimática, por sua vez, investiga os fatores que influenciam a velocidade em que ocorre a reação catalisada por enzimas. Entre alguns fatores que determinam a eficiência da reação enzimática temos a concentração e disponibilidade do substrato,

a estabilidade da enzima no decorrer da reação, o pH da mistura, a temperatura e a presença de inibidores (ROBINSON, 2015). Muitas reações ou consomem ou geram prótons, alterando o pH no decorrer do tempo, logo, a maioria das enzimas possui um pH ótimo acima ou abaixo do qual a velocidade da reação diminui, uma vez que a ionização em grupos no sítio ativo ou no substrato pode alterar a afinidade entre eles. A temperatura aumenta a taxa de movimentação das moléculas e, assim, a taxa de reação, mas também causa inativação enzimática progressiva por desnaturação. Além disso, há importância na presença de inibidores, os quais influenciam direta ou indiretamente as propriedades catalíticas do sítio ativo. De forma geral, o entendimento da estrutura, das características funcionais e dos mecanismos de ação das enzimas ajudam a entender e controlar estes fatores que influenciam a cinética enzimática e otimizar os processos de obtenção dos produtos da reação.

Em relação às LPMOs, seu mecanismo de ação se centraliza na alteração do estado redox do átomo de cobre presente no sítio ativo, o qual muda de um estado Cu(II) para um estado reduzido Cu(I) com a formação de um intermediário altamente reativo (HAGEMANN; HEDEGÅRD, 2023). Esse intermediário oxida as ligações glicosídicas dos polissacarídeos, formando radicais livres nos monômeros de açúcar adjacentes, levando à clivagem da cadeia e expondo mais terminações à ação de glicosil hidrolases, o que resulta em um impulso ao processo de sacarificação (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). O estado redox então se alterna entre Cu(II) e Cu(I) ao longo da reação enzimática. Já a hidrólise ocorre por meio da ação de outras enzimas hidrolíticas, que quebram a cadeia já enfraquecida pelas LPMOs.

Além disso, a hidroxilação e a transglicosilação levam à formação de novas ligações químicas entre os monômeros de açúcar, gerando estruturas moleculares intermediárias (TANDRUP et al., 2018). Como exemplo, a oxidação da cadeia glicosídica no carbono C1, o que parece ser a principal atividade das LPMOs, na celulose gera fragmentos de tamanhos variados, porém, apenas os fragmentos menores são solúveis, e os fragmentos maiores são menos frequentes se a reação ocorre com coquetéis enzimáticos contendo outras enzimas (como hidrolases) além das LPMOs (Figura 5).

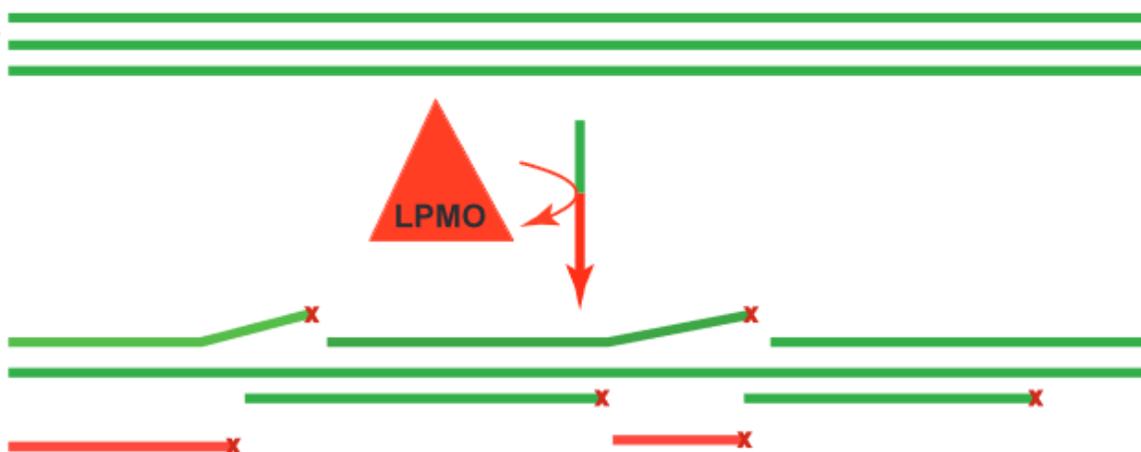


Figura 5: Oxidação do carbono C1 na celulose. No topo da imagem são exibidas as cadeias celulósicas (em verde). A LPMO com atividade em C1 oxida (“x” em vermelho indica oxidação) e cliva o substrato em fragmentos grandes (verdes) e pequenos (vermelhos), porém, apenas os fragmentos pequenos são solúveis. O número de fragmentos pequenos aumenta se são utilizados coquetéis enzimáticos. Fonte: Adaptado de Westereng et al. (2013).

Logo, o principal efeito das LPMOs sobre o substrato é a oxidação de carbonos C1 e/ou C4 na interface de ligação glicosídica, quando um hidrogênio é removido de um destes carbonos, e há a hidroxilação do radical resultante, levando à desestabilização da ligação glicosídica e sua clivagem (PHILLIPS et al., 2011). A clivagem oxidativa da cadeia expõe mais pontos de acesso à atividade hidrolítica das glicosil hidrolases, aumentando assim a eficiência do processo enzimático. Para que ocorra esta atividade oxidativa, é necessário  $O_2$  ou  $H_2O_2$  (preferencialmente este último) como co-substrato, bem como um doador externo de elétrons de natureza enzimática ou não (por exemplo, ácido ascórbico, ácido gálico, celobiose desidrogenase (CDH) ou mesmo produtos fenólicos gerados pela própria degradação da lignina, conforme revisado em Wang et al., (2021).

A preferência por C1/C4 representa a regioesletividade da LPMO. No caso do substrato celulósico, por exemplo, a regioespecificidade de determinada LMPO pelo carbono C1 produz lactonas (as quais espontaneamente convertem para ácido aldônico em condições fisiológicas), enquanto a regioespecificidade para o carbono C4 produz cetonas (que espontaneamente convertem para gemdiols), como ilustrado na Figura 6, ou uma mistura dos dois, caso a LPMO tenha resioesletividade C1/C4. Existe também a preferência enzimática pelo carbono C6, porém é mais rara.

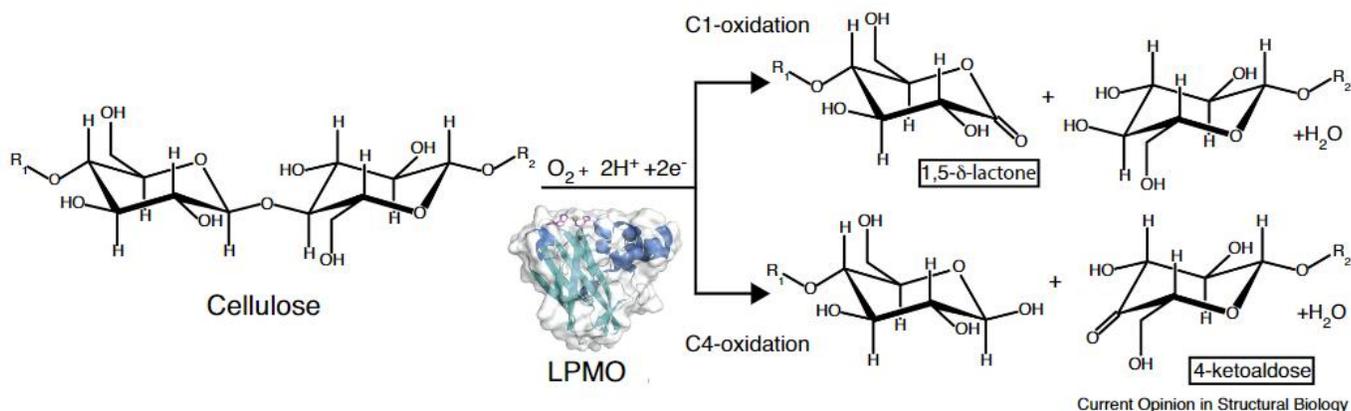


Figura 6: Produtos da clivagem da ligação glicosídica em celulose, conforme regioespecificidade para o carbono C1 ou C4. A preferência por C1 gera lactonas, que convertem para ácido aldônico, e a preferência por C4 gera cetonas, que convertem para gemdióis. Fonte: Vaaje-Kolstad et al. (2017).

O que determina essa preferência pelo carbono C1 e/ou C4, pelo menos em LMPOs da família AA9, parece ser a proximidade do núcleo de cobre com um ou outro carbono, durante a ligação da enzima ao seu substrato. Por exemplo, a distância entre o íon de cobre da enzima MtLPMO9L e o hidrogênio ligado ao carbono C1 da ligação glicosídica celulósica é 1,3 Å menor que a distância do íon de cobre ao hidrogênio ligado ao carbono C4, favorecendo a atividade C1 da MtLPMO9L (ZHOU et al., 2020). Assim, a estrutura do substrato, a composição da cadeia de aminoácidos presentes na superfície de ligação ao substrato, os tipos de CBM existentes nessa superfície, são prováveis fatores que podem determinar ou alterar a regioespecificidade das LPMOs (FRANSEN et al., 2016).

Algumas técnicas baseadas em espectrometria de massas existem para avaliar experimentalmente a atividade enzimática das LPMOs com base nos produtos liberados em um experimento de desestruturação de polissacarídeos (EIJNSINK et al., 2019). Por exemplo, a ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF-MS, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight - Mass Spectrometry*) é uma técnica muito sensível que permite comparar o espectro de massas produzido pela ação das LPMOs com o espectro de massas produzido por um grupo controle (sem a enzima ou com a enzima inativada) e avaliar qualitativamente a eficiência

enzimática observando os picos de espectro produzidos pelo espectrômetro. Dessa forma pode-se ter uma visão intuitiva das quantidades relativas (perfis) de produtos gerados, porém, é limitada quanto à quantificação dos produtos e, devido à alta sensibilidade, necessita de cuidados relativos à existência de impurezas, as quais podem se manifestar como ruído no gráfico e dificultar a detecção.

Outra técnica muito utilizada é a cromatografia de alta performance com troca de ânions e detecção amperométrica pulsada via HPAEC-PAD (do inglês, *High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*), que permite separação de glicanos ionizados negativamente com base em sua carga elétrica, conforme os glicanos carregados passam por uma fase estacionária dentro de uma coluna, e quantificação das concentrações dos glicanos identificados, por meio do gráfico sinal versus tempo de retenção (WESTERENG et al., 2013). Wang et al. (2021) revisaram de forma compreensiva diferentes métodos atuais disponíveis para comparar experimentalmente (quali e/ou quantitativamente, direta ou indiretamente) a atividade enzimática de diferentes LPMOs em diferentes substratos. De forma geral, porém, a mensuração da atividade das LPMOs não é tão simples, uma vez que uma pequena porção dos oligômeros de ácido aldônico e cetoaldose solúveis são liberados após a catálise, e a maioria dos produtos oxidados permanece ligada ao substrato, enquanto os métodos de detecção se concentram principalmente na identificação de produtos solúveis. Em outras palavras, o poder oxidativo das LPMOs é proporcional ao substrato polissacarídico insolúvel oxidado, enquanto a análise quali e quantitativa nesse contexto é complexa.

Em síntese, as LPMOs, que são também conhecidas como enzimas redox auxiliares, desempenham um papel fundamental na degradação de biomassa lignocelulósica, sendo capazes de oxidar componentes da parede celular de plantas, como celulose e hemicelulose, e quitina, tornando esses materiais mais acessíveis a outras enzimas que podem quebrá-los em açúcares simples. Portanto, essas enzimas desempenham um papel importante na promoção da biodegradação e na transição para uma economia mais sustentável baseada em biomassa.

De fato, as LPMOs e seu uso na indústria têm sido descritos na literatura de patentes e os exemplos a seguir destacam o interesse comercial e o potencial econômico do uso das LPMOs como ferramentas em processos biotecnológicos, na despolimerização de celulose (HARRIS et al., 2010) e amido (SOONG; SAUNDERS, 2011). Em outro caso, os inventores reivindicaram a utilização de uma LPMO do tipo AA9 com atividade em xilano (KOETSIER et al., 2016). Os

xilanos são componentes-chave da hemicelulose, relacionados com a integridade da parede celular das plantas. A remoção de xilanos aumenta a eficiência das enzimas comerciais, provavelmente ao tornar o substrato mais acessível (JEOH et al., 2007).

As LPMOs também podem melhorar a fermentação de açúcares derivados do amido, reduzindo a formação de ácido láctico ou acético durante a incubação (GASPAR et al., 2019). Além disso, várias solicitações de patentes divulgaram sequências de DNA que codificam variantes de aminoácidos de LPMOs com características desejáveis, como exemplificado por Lin et al. (2019). Em linhas gerais, dentre as aplicações das LPMOs destacam-se:

- (i) **Indústria de biocombustíveis:** As LPMOs são usadas na produção de biocombustíveis, como etanol de segunda geração, através da quebra eficiente de celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis. Isso torna a produção de biocombustíveis a partir de biomassa mais econômica e sustentável.
- (ii) **Indústria de alimentos:** LPMOs são usadas na produção de ingredientes alimentares e aditivos, como xilitol e xarope de milho rico em frutose. Elas podem melhorar a eficiência da conversão de amido em açúcares simples, que são usados na fabricação de alimentos e bebidas.
- (iii) **Indústria de papel e celulose:** As LPMOs têm um potencial significativo na indústria de papel e celulose para melhorar a eficiência na produção de papel a partir de matéria-prima lignocelulósica. Elas ajudam a reduzir a quantidade de produtos químicos necessários no processo de branqueamento e podem aumentar a qualidade do papel.
- (iv) **Biorremediação:** As LPMOs também podem ser aplicadas na biorremediação, ajudando a degradar resíduos de plantas, como palha e serragem, contaminados com poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos. Isso ajuda a limpar ambientes poluídos de maneira mais eficaz.
- (v) **Produção de produtos químicos:** Além de açúcares fermentáveis, as LPMOs também podem ser usadas para produzir produtos químicos de alto valor a partir da biomassa, como ácido glucônico, que é usado na indústria farmacêutica e química.
- (vi) **Agricultura:** LPMOs também podem ser aplicadas na agricultura para melhorar a digestibilidade de rações para animais. Isso pode levar a uma utilização mais eficiente dos recursos alimentares e a uma produção animal mais sustentável.

- (vii) Tratamento de Águas Residuais: As LPMOs podem ser usadas para degradar componentes lignocelulósicos em águas residuais de indústrias, tornando o tratamento dessas águas mais eficiente e ecológico.

#### **2.4 As cianobactérias no contexto da bioeconomia**

As cianobactérias são organismos procariontes e autótrofos fotossintetizantes, isto é, são capazes de capturar a luz solar e usá-la para a produção de energia e fixação de carbono. Elas constituem um dos mais antigos grupos de organismos da terra, às quais se atribui a construção de uma atmosfera aeróbica que culminou no aparecimento de outros organismos com maior grau de complexidade (KULASOORIYA, 2012). Sua longa e complexa história evolutiva resultou em uma não menos complexa classificação taxonômica (KOMÁREK et al., 2014). Atualmente, existem descritas mais de 2500 espécies em mais de 150 gêneros de cianobactérias, que apresentam ampla diversidade de formas e tamanhos e que podem ser encontradas nos mais variados tipos de habitats ao redor o mundo, constituindo a microflora dominante em termos de biomassa total e produtividade em muitos deles.

Essa pluralidade faz das cianobactérias uma das fontes mais ricas em compostos bioativos, os quais possuem inúmeras propriedades de interesse biotecnológico, incluindo dentre outras, atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, podendo atuar também reprimindo a resposta inflamatória e o desenvolvimento de células neoplásicas (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009; RASTOGI; SINHA, 2009; DUCAT; WAY; SILVER, 2011; VIJAYAKUMAR; MENAKHA, 2015).

Das inúmeras aplicações atribuídas às cianobactérias, o potencial de produção de biocombustíveis de terceira geração é uma das mais promissoras, e os relatos incluem a produção de biodiesel (ABOIM et al., 2019; YADAV et al., 2021; SADVAKASOVA et al., 2021), etanol (Erdrich et al., 2014; Dexter et al., 2015; Qi et al., 2017), isobutanol (ERDRICH et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2022) e alcanos (KLÄHN et al., 2014; ARAI; HAYASHI; KUDO, 2018; PARVEEN; YAZDANI, 2022). Embora, a produção de biocombustíveis por organismos fotossintetizantes seja geralmente baixa, os progressos em engenharia biológica e de bioprocessos em adição ao maior conhecimento da fisiologia desses microrganismos têm pavimentado o caminho para a sua utilização em aplicações de bioenergia.

Além de sua capacidade de produção de biomoléculas de valor agregado (como descrito acima), as cianobactérias desempenham outro papel importante, e quase inexplorado, na dinamização da bioeconomia através da biossíntese de enzimas, tais como amilase (REYES-SOSA; MOLINA-HEREDIA; DE LA ROSA, 2010), protease (PRASANNA et al., 2008; MARTINS et al., 2013; ELLEUCH et al., 2021; PATIPONG; KAGEYAMA; WADITEE-SIRISATTHA, 2021) e xilanase (PRASANNA et al., 2008), que têm uma ampla gama de usos comerciais. Contudo, apesar de sua importância, nenhuma LPMO de origem cianobacteriana foi, até o presente, descrita na literatura, sendo esta pesquisa a primeira a prospectar LPMOs de origem cianobacteriana.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MINERAÇÃO GENÔMICA

A busca por LPMOs em grupos taxonômicos de cianobactérias (Filo Cyanobacteriota, taxonid: 1117) foi realizada utilizando perfis Ocultos de Markov via servidores do *European Bioinformatics Institute* (EBI), buscando-se por padrões relativos às famílias de AA9 a AA10 do CAZy. Para isso, foi utilizado o programa “hmmsearch” (<http://hmmer.org/>), que busca padrões de HMM contra bancos de dados inteiros de sequências proteicas, ou o programa “pHMMer”, que busca uma sequência proteica fornecida pelo usuário contra bancos de dados de sequências. Ambos com e-value de *cutoff* de 0,01 para as sequências e 0,03 para os domínios. Os resultados obtidos foram filtrados por busca ativa no banco de dados de domínios proteicos do *Conserved Domain Database* (CDD/NCBI).

#### 3.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a análise filogenética, as sequências proteicas completas das LPMOs da família AA10 já caracterizadas foram obtidas do banco de dados CAZyme ([http://www.cazy.org/AA10\\_characterized.html](http://www.cazy.org/AA10_characterized.html)), além da MtLPMO10 de *Mastigocoleus testarum* BC008 e três sequências externas de LPMOs da família AA9. Estas sequências foram truncadas para remover prováveis peptídeos-sinal da porção N-terminal e domínios de ligação a carboidratos (CBM) ou outros domínios da porção C-terminal, mantendo-se apenas os domínios catalíticos. Foram então submetidas ao alinhamento múltiplo de sequências usando o algoritmo MUSCLE no *software* MEGA versão 11.0.13.

O alinhamento múltiplo foi submetido à filogenia de máxima verossimilhança (ML, do inglês *Maximum Likelihood*) precedida de repetições de *bootstrap* no programa RAxML versão 8.2.12 dentro da infraestrutura de supercomputadores do CIPRES Science Gateway, com as seguintes configurações: modelo de substituição baseada em matriz MTT com 25 categorias discretas e *bootstrap* de até 1000 repetições, com parada automática após 400 repetições. Para a visualização dos resultados da filogenia foi utilizado o *software* Figtree versão 1.4.4. A busca por similaridades de sequências foi realizada via BLASTp-PDB para encontrar estruturas de maior identidade de sequências com a MtLPMO10 e BLASTp-RefSeq para investigar o grau de conservação de resíduos da proteína de interesse. O ESPript 3.0 foi utilizado para gerar figuras compreensíveis do alinhamento múltiplo de sequências (ROBERT; GOUET, 2014).

### 3.3 MODELAGEM MOLECULAR

A predição de estrutura terciária proteica foi realizada usando abordagens diversas, seja por modelagem por homologia, modelagem *de novo* ou abordagens híbridas. As estruturas terciárias foram modeladas no Phyre2, I-Tasser, Swiss-Model, Modeller, RoseTTAfold e AlphaFold2. O modelo mais adequado foi obtido no AlphaFold2, o qual se baseia em métodos de aprendizagem de máquinas, incluindo redes neurais, para prever a estrutura tridimensional com base na sequência de aminoácidos fornecida (JUMPER et al., 2021). Para estimar a qualidade do modelo estrutural gerado, foram usados o Molprobitry (<http://molprobitry.biochem.duke.edu/>), para avaliar a qualidade estereoquímica dos modelos, o Verify3D (<https://www.doe-mbi.ucla.edu/verify3d/>), para avaliar o enovelamento proteico, e o QMEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>), para mensurar a qualidade local do modelo. A provável posição do cobre no centro ativo da MtLPMO10 foi obtida pela sobreposição de estruturas com a proteína Tma12 (PDB-ID 6IF7).

### 3.4 DINÂMICA MOLECULAR

As simulações de Dinâmica Molecular (DM) foram realizadas com o objetivo de validar os modelos gerados na etapa de modelagem molecular, bem como, avaliar a afinidade da MtLPMO10 por seus prováveis substratos em meio aquoso. Foram montados três sistemas diferentes: a) MtLPMO10 complexada com quitina; b) MtLPMO10 complexada com celulose; c) SmAA10A complexada com quitina, como controle positivo, dado que sua especificidade por quitina e regioseletividade para C1 já estão bem caracterizadas na literatura, e a interação desta LPMO com o ligante em simulações de DM já foi bastante explorada (BISSARO et al., 2018). Como ligantes foram utilizados modelos tridimensionais de oligossacarídeos de quitina (monômeros de N-acetilglicosaminas ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$ , com 8 unidades no sistema “a”) e celulose (monômeros de glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1-4)$ , com 8 unidades no sistema “b”). Os achados relativos ao sistema “a” foram confirmados através de triplicata da simulação.

A pose inicial do sistema “c” foi obtida por *docking* manual, posicionando-se um modelo de quitohexaose ao longo do caminho formado pelos resíduos Tyr54, His28, His114 e Asp182 (os quais são importantes na interação SmAA10A-ligante) de tal forma que tanto o H1 quanto o H4 mais próximos do cobre ficassem mais ou menos equidistantes do metal, ou seja, sem uma

regioseletividade pré-estabelecida. A pose inicial nos sistemas “a” e “b” foi obtida sobrepondo-se estruturalmente a MtLPMO10 à SmAA10A equilibrada com a quitohexaose e substituindo-se a quitohexaose pelos respectivos ligantes de interesse em cada caso (oligômeros de quitina ou celulose).

Para preparação dos arquivos da DM foi utilizado o servidor H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/index.php>) considerando o pH 7.0 e as demais opções com parâmetros padrões para protonação da proteína. Para a montagem do sistema, preparação e solvatação, bem como as etapas de minimização de energia, aquecimento e dinâmica molecular foram empregadas as ferramentas incluídas dentro do pacote de programas AMBER 23 (<http://ambermd.org/>) utilizando os campos de forças Glycam06\_j (TESSIER et al., 2008) para os carboidratos, gaff (WANG et al., 2004) para os íons e o campo de forças ff14SB (MAIER et al., 2015) para a proteína. Após a montagem dos sistemas, eles foram solvatados com o modelo de água TIP3P em uma caixa octaédrica de 10 Å de tamanho. Aos sistemas foram ainda adicionados íons Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup> para neutralizar as cargas a fim de tornar a simulação mais estável. Dessa forma foram gerados os arquivos de topologia, coordenadas e parâmetros a usar na dinâmica molecular.

Além disso, foi necessário fazer a parametrização do centro de cobre usando o script MCPB.py (LI; MERZ, 2016) incluído no pacote AMBER 23, gerando-se um campo de força para o centro ativo da proteína. A região de mecânica quântica para o campo de forças incluiu o cobre e os resíduos ligados a ele usando o conjunto de base B3LYP e 6-31G(d,p) do pacote Gaussian09. O raio atômico do cobre foi definido como 3 Å durante o cálculo de ajuste de cargas pelo método *Restrained Electrostatic Potential* (RESP).

Após montados os sistemas, todos seguiram para etapa de minimização de energia no *software sander*. A minimização ocorreu em 5 etapas, onde nas 4 etapas iniciais os átomos pesados tiveram seu movimento restringido por um potencial harmônico de 1000 Kcal/mol\*Å<sup>2</sup> enquanto que na etapa final todos os átomos estiveram livres. Foi utilizado o *ensemble* NVT durante a minimização. No total foram realizados 3000 ciclos do tipo *steepest descent* e 5000 ciclos de gradiente conjugado nas 4 primeiras etapas, apenas na última etapa foram realizados 5000 ciclos de *steepest descent* e 20000 ciclos de gradiente conjugado.

Para o aquecimento, foi utilizado o mesmo princípio da minimização de energia, porém em um maior número de etapas, 14 no total, e com um menor potencial harmônico restringindo os

átomos pesados,  $25 \text{ Kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$  que foi reduzida até 0 nas etapas finais. Nas 13 primeiras etapas a temperatura foi elevada gradualmente até chegar a 300 K em um *ensemble* NVT, em um total de 650 picossegundos. Na última etapa foram produzidos 2 ns de simulação em um *ensemble* NPT para a equilibração do sistema. A escala de temperatura empregada no aquecimento e dinâmica foi a de Langevin com frequência de colisão  $3.0 \text{ ps}^{-1}$ . O algoritmo SHAKE foi empregado para restringir o comprimento das ligações de todos os átomos de hidrogênio. O método *Particle Mesh Ewald* foi empregado para o cálculo das interações eletrostáticas utilizando um valor de *cutoff* de  $10.0 \text{ Å}$  para interações não ligadas. Dessa forma, foram produzidos 100 ns de dinâmica molecular para cada sistema, para posterior análise estrutural das proteínas com seus respectivos ligantes através do RMSD calculado a partir dos átomos N, CA e C da cadeia principal pelo módulo cpptraj (AMBER 23) e para os cálculos de energia livre.

### 3.5 ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO

Para calcular a energia livre de ligação do complexo enzima-substrato dos sistemas foram utilizados 3 métodos: *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area* (MM/GBSA) e *Molecular Mechanics-Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM/PBSA). Estes métodos são classificados como métodos de “estado final” já que avaliam a diferença de energia de dois estados finais do sistema: ligado e não-ligado.

Então, após serem produzidos 100 ns de simulação de DM, os sistemas seguiram para as análises de energia livre através das duas metodologias, utilizando-se os últimos 10 ns (5000 frames) de simulação onde os sistemas deveriam estar estabilizados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 BUSCA ATIVA POR LPMOS CIANOBACTERIANAS

A busca por LPMOs em cianobactérias via *Hidden Markov Models* e CDD retornou uma proteína de 289 aminoácidos (acesso KST64526.1 no NCBI), predita a partir do sequenciamento genômico de 12,7Mb da espécie filamentosa *Mastigocoleus testarum* BC008 da Ordem Nostocales. Esta cianobactéria possui habitat marinho, sendo encontrada em ambientes bentônicos como produtores primários, vivem em superfícies sólidas ricas em carbonato, com um papel importante na dissolução de esqueletos de corais e na erosão de afloramentos costais e terrestres ricos em carbonatos (GUIDA; GARCIA-PICHEL, 2016).

A proteína encontrada nesta pesquisa possui um peptídeo sinal dos resíduos Met1 a Gly30 predito pelo SignalP, um domínio LPMO\_AA10 (cd21177) dos resíduos His31 a Ile220, um domínio de ligação a carboidratos da superfamília CBM dos resíduos Trp245 a Arg286 (IPR036573) e, neste último, um domínio de ligação a quitina (ChiA1\_BD) dos resíduos Pro244 a Asp283 (cd12214) (Figura 7). Aqui, a proteína é mencionada como MtLPMO10.

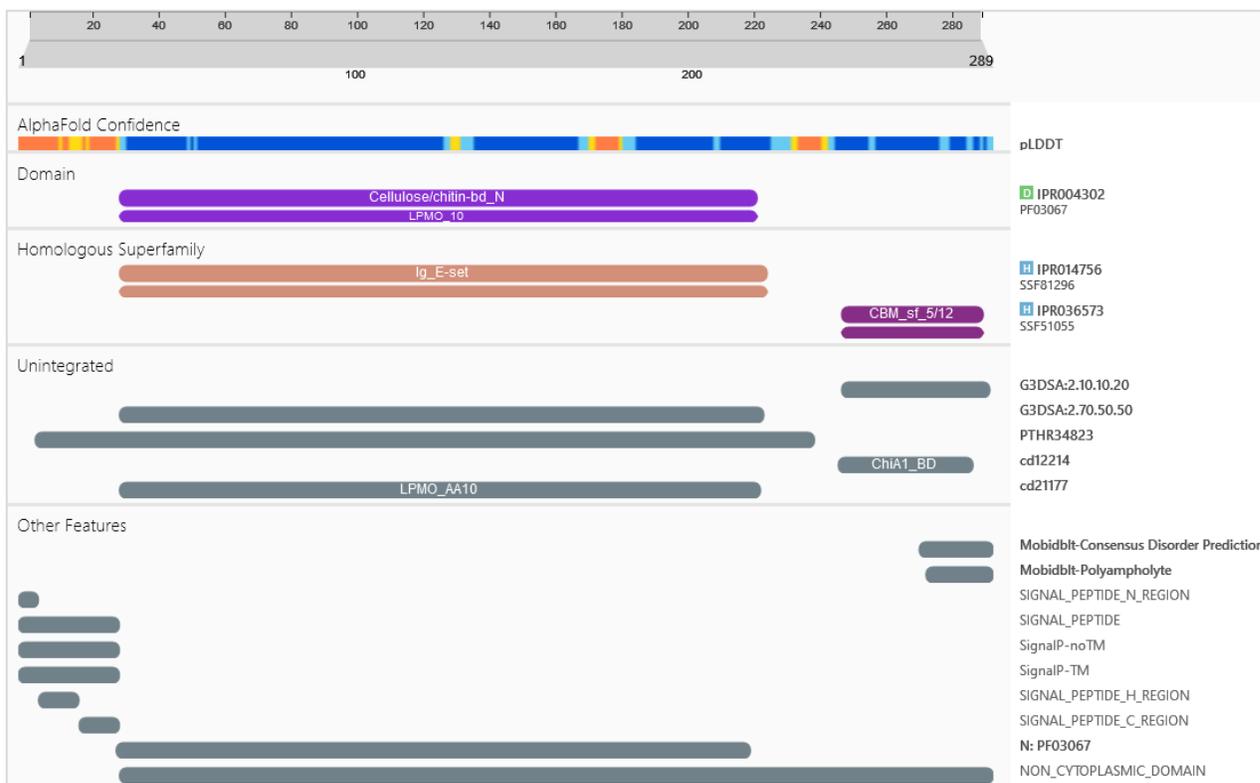


Figura 7: Domínios e estrutura da LPMO putativa.

A busca por similaridades a sequência proteica completa de 289 aminoácidos, usando a ferramenta phmmer, retornou 8498 correspondências entre proteínas bacterianas do UniprotKB, porém, apenas o registro da proteína submetida foi retornado para o Filo Cyanobacteria inteiro. Em comparação com outras bactérias, houve 5479 (64,5%) correspondências dentro do Filo Actinobacteriota, 1274 (15%) do Filo Firmicutes, ambos do Clado Terrabacteria (grupo ao qual o Filo Cyanobacteria está também alocado), e 1633 (19,2%) do Filo Proteobacteria, o qual está fora do Clado Terrabacteria. Houve 36 correspondências no Super Reino Eucariota, sendo destes, 17 (47,3%) em fungos. Em resumo, a maioria das similaridades ocorreu dentro do próprio clado Terrabacteria, mas fora do Filo Cyanobacteria.

#### 4.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DA MtLPMO10

A análise de filogenia da MtLPMO10, considerando os módulos catalíticos de outras proteínas já caracterizadas segundo o CAZy (Figura 8), mostrou que o sítio catalítico é filogeneticamente mais próximo da enzima Tma12 da samambaia *Tectaria macrodonta*, que possui alta similaridade de sequências com outras enzimas da família AA10. Além disso, a caracterização da estrutura cristalográfica da Tma12 mostrou similaridades estruturais com outras LPMOs, provendo evidências de que seria a primeira LPMO encontrada no reino vegetal (YADAV et al., 2019). A MtLPMO10 e a Tma12 compartilharam um mesmo ramo da árvore filogenética, e ambas se posicionaram mais próximas de outras LPMOs celulolíticas, em especial aquelas com regioseletividade para C1, ao passo que o cluster de 12 LPMOs com especificidade para quitina (marcadas em linha tracejada na Figura 8) se mantiveram em posição oposta.

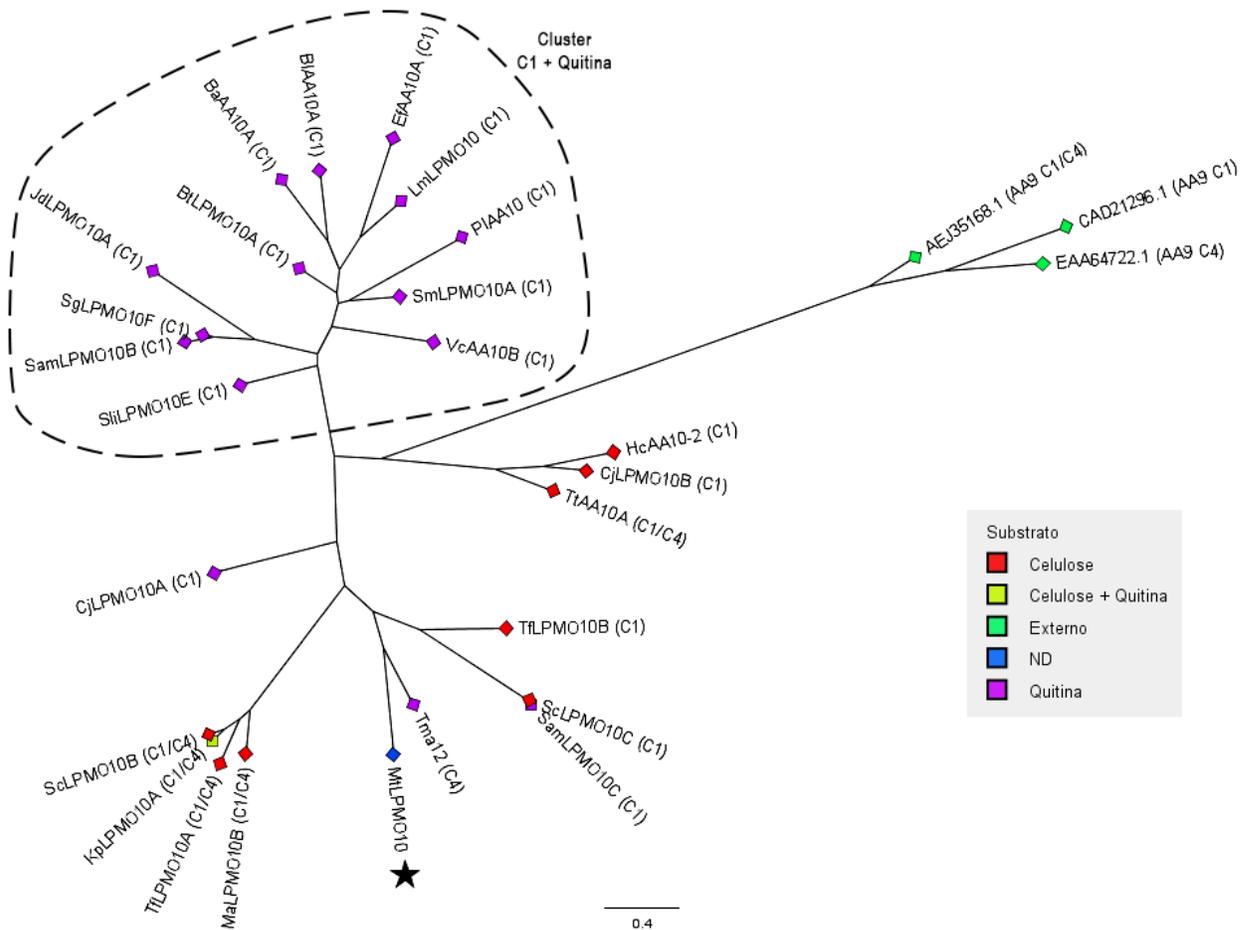


Figura 8: Árvore filogenética dos módulos catalíticos caracterizados na família de enzimas AA10. A estrela indica o módulo catalítico da proteína cianobacteriana. As sequências catalíticas foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE e submetidas ao programa RAxML em 400 iterações de *bootstrap* seguidas de análise de máxima verossimilhança para escolha da melhor solução. Entre parênteses está a região de preferência. A linha pontilhada indica um cluster de enzimas com afinidade por quitina no carbono C1. Os diamantes coloridos indicam a afinidade a substratos caracterizada para cada enzima, exceto para a cor verde, que indica o grupo externo da família AA9. ND: não definido.

A MtLPMO10 compartilha no mínimo 40% de identidade de sequências com três proteínas cujas estruturas tridimensionais estão resolvidas experimentalmente: Tma12 (PDB ID 6IF7 de *Tectaria macrodonta* – 52,11% de identidade), CbpD (8C5N de *Pseudomonas aeruginosa* – 49,21% de identidade) e ScLPMO10D (7ZJB de *Streptomyces coelicolor* – 47,92% de identidade) (Tabela 1). A Tma12 possui atividade quitinolítica com regioesletividade para C4 e aplicação como inseticida em plantações de algodão transgênico (SHUKLA et al., 2016; YADAV et al., 2019). A

CbpD é uma LPMO trimodular com atividade quitinolítica, envolvida em mecanismos de virulência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, conhecida por causar infecção nosocomial em humanos (ASKARIAN et al., 2021). A ScLPMO10D, inicialmente denominada CbpC (WALTER; SCHREMPF, 2008), é uma LPMO incomum por ser uma proteína com ancoramento à parede celular, com um domínio na porção C-terminal que possui essa função. Todas possuem atividade quitinolítica.

Tabela 1: Estruturas cujas sequências compartilham ao menos 40% de identidade com a sequência de aminoácidos da MtLPMO10.

Busca de similaridades via BRASTp-PDB usando parâmetros-padrão. Apenas as identidades  $\geq 40\%$  são consideradas.

PDB	Identidade	E-value	Proteína	Origem	CAZy	Substrato	Ref.
6IF7_A	52,11%	1e-57	Tma12	<i>Tectaria macrodonta</i>	AA10	Quitina (C4)	Yadav et al., (2019)
8C5N_A	49,21%	1e-54	CbpD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AA10	Quitina	Askarian et al. (2023)
7ZJB_B	47,92%	2e-47	ScLPMO10D	<i>Streptomyces coelicolor</i>	AA10	Quitina (C1)	Votvik et al., (2023)

O alinhamento múltiplo da sequência da MtLPMO10 com as sequências destas estruturas conhecidas (Figura 9), isto é, Tma12, CbpD e ScLPMO10D, mostrou que as histidinas His25 e His127, que formam a braçadeira de histidinas na Tma12, bem como a Phe198 que está na esfera secundária de coordenação do centro de cobre, são altamente conservadas entre as quatro sequências (setas rosa). Na MtLPMO10, os resíduos homólogos são a His31, His132 e a Phe213. Além disso, outros resíduos a pelo menos 5 Å de distância do cobre na Tma12 (Ala125, Arg191 e Glu196, exibidos em fundo verde), são também conservados na MtLPMO10, com exceção do resíduo hidrofóbico Ala125, que na MtLPMO10 foi substituída por uma treonina (Thr130, polar).

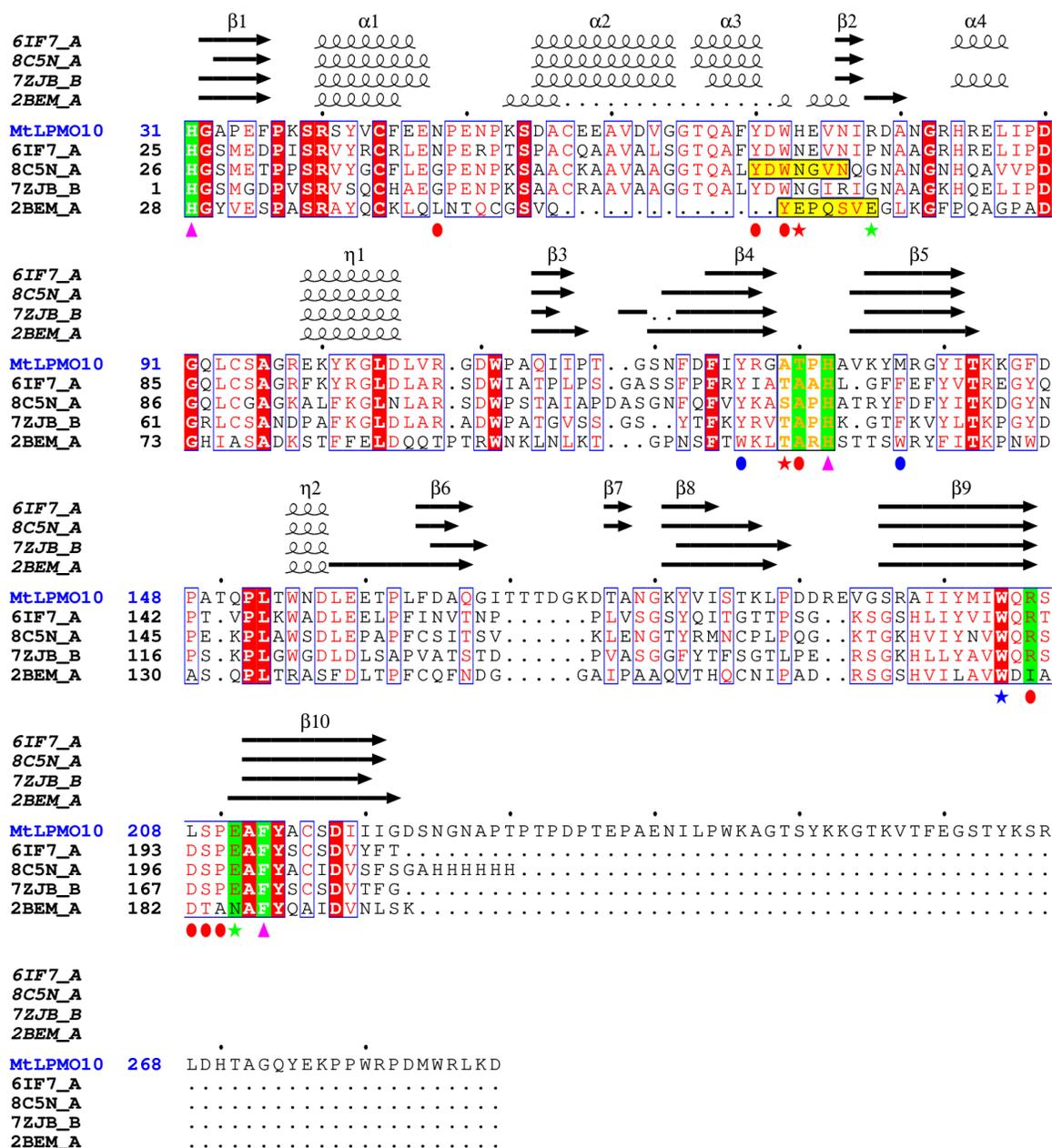


Figura 9: Alinhamento das sequências de maior identidade com a MtlLPMO10 e que possuem estrutura experimentalmente determinada no PDB. O alinhamento múltiplo de sequências inclui a MtlLPMO10, Tma12 (PDB ID: 6IF7), CbpD (8C5N) e ScLPMO10D (7ZJB). A SmLPMO10A (PDB ID: 2BEM) é adicionada para referência. As estruturas proteicas secundárias são exibidas acima das sequências. As setas rosas indicam as histidinas da braçadeira que coordenam o centro metálico e a fenilalanina da esfera de coordenação secundária. As bolas vermelhas indicam dez resíduos com maior afinidade pela quitina após a dinâmica molecular com a MtlLPMO10, mais a His31 na seta rosa e a His73 na estrela vermelha. Em fundo

verde são marcados os resíduos com distância até 5 Å do cobre na Tma12, e seus respectivos homólogos. Em letras laranja são marcados os resíduos do padrão “TAXH” de reconhecimento de quitina. A estrela azul marca o triptofano conservado do padrão “WWW” e as bolas azuis marcam os outros dois resíduos desse padrão. As estrelas vermelhas marcam o par de reconhecimento de quitina Gln-Thr. As estrelas verdes marcam o par de acesso ao túnel controlador de acesso ao centro catalítico. O fundo amarelo indica o consenso “Y(W)EPQSVE”. Os resíduos são numerados conforme o respectivo registro no PDB.

Observa-se também que a porção C-terminal da MtLPMO10 é uma região bem única, incluindo os resíduos Trp245 até Arg286 que correspondem ao domínio de ligação a carboidratos CBM. Esta, de fato, é uma região com baixa identidade com outras sequências proteicas conhecidas dentro do RefSeq/ NCBI (busca feita via BLASTp-RefSeq, dados não mostrados). Os dez resíduos mais importantes na simulação de dinâmica molecular (ver mais adiante) são apontados em oito bolas vermelhas mais a His31 (seta rosa) e a His73 (estrela vermelha), na Figura 9.

No alinhamento múltiplo, além das sequências da Tma12, da CbpD e da ScLPMO10D, foi incluída a sequência da SmAA10A (PDB ID 2BEM), que é uma das LPMOs AA10 mais bem caracterizadas. Produzida pela bactéria *Serratia marcescens* e inicialmente chamada CBP21, a SmAA10A compartilha 25,26% de identidade com a MtLPMO10 e deu origem à classe de enzimas AA10 (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). Ela foi incluída para análise comparativa com as demais sequências. São conservados na SmAA10A tanto as histidinas da braçadeira quando a fenilalanina que coordena o cobre, porém, dos demais resíduos a 5 Å de distância do cobre na Tma12, Arg191 e Glu196 não são conservadas na SmAA10A (fundo verde).

Apesar disso, existe concordância na formação de estruturas secundárias entre as cinco sequências proteicas. Em especial, observa-se a longa sequência existente entre as fitas  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , conhecida como região L2. A SmAA10A é mais divergente no L2 em relação às quatro outras sequências, com um grande *gap* nessa região, refletindo maior distanciamento evolutivo desta em relação às demais. Nota-se também uma região na MtLPMO10, nas posições Thr170-Lys175, que não tem correspondentes nas demais sequências, mas essa região está fora da provável superfície de contato com o ligante.

Um triptofano (Trp204 na MtLPMO10), bem conservado na classe AA10, ocorre entre todas as cinco sequências (Figura 9, estrela azul), presente na esfera de coordenação secundária do cobre. Ele parece importante em proteger o sítio ativo da inativação oxidativa da enzima (FORSBERG et al., 2014). Este triptofano faria parte de um padrão “WWW”, com três triptofanos

na região de coordenação secundária do cobre. Embora não expostos na superfície, este trio tem sido relatado como frequente entre as LPMOs AA10 quitinolíticas (BEESON et al., 2015), incluindo a SmAA10A (estrela azul e bolas azuis na Figura 9). Porém, na CbpD eles correspondem ao trio Tyr123-Phe134-Trp192 (DADE et al., 2022), com os mesmos resíduos encontrados na Tma12 e na ScLPMO10D, ou seja, o padrão de três resíduos aromáticos permanece, porém sua identidade é alterada. Na MtLPMO10 este trio é Tyr126-Met137-Trp204, ou seja, com uma metionina, hidrofóbica, substituindo a fenilalanina.

Um padrão frequentemente chamado de “padrão de reconhecimento de quitina” (BISSARO et al., 2018; JENSEN et al., 2019; DADE et al., 2022) é conservado na família AA10 e composto dos resíduos “TAXH” (representados em letra laranja na Figura 9), sendo H o segundo resíduo da braçadeira de histidina e X um de A/M/P/Q/R. A MtLPMO10 possui uma prolina como resíduo X, assim como a CbpD e a ScLPMO10D, mas todas diferem da Tma12 e da SmAA10A. Além disso, a CbpD possui uma alteração conservativa de treonina para serina no primeiro resíduo, assumindo um padrão “SAPH”, enquanto a MtLPMO10 possui uma permuta entre a treonina e a alanina na posição dos dois primeiros resíduos deste padrão, ou seja, seu perfil é “ATPH”.

Uma sequência consenso “Y(W)EPQSVE”, presente na região L2, foi proposta por Zhou et al. (2019) para as LPMOs AA10 quitinolíticas. Enquanto a SmAA10A possui este consenso, segundo Dade et al. (2022), a CbpD possui a sequência “YDWNGVN” (em fundo amarelo na Figura 9), o qual é similar tanto na MtLPMO10 quanto na Tma12. Nestes últimos três casos, o motivo assume a forma “YDWXXVN”, em que “XX” é Asn-Gly na CbpD, enquanto na MtLPMO10 a asparagina é substituída por um resíduo aromático (His73) e a glutamina é substituída por um ácido glutâmico (Glu74).

Outro padrão relatado com frequência na classe AA10 é um par de resíduos polares glutamina-treonina (Gln-Thr) altamente conservados e envolvidos no reconhecimento de quitina (ZHOU; ZHU, 2020) (Figura 9, estrelas vermelhas), sendo que a treonina é o primeiro resíduo do padrão “TAXH”. Na CbpD, este par é Asp66-Ser126, ou seja, dois outros resíduos polares homólogos são encontrados neste par, uma vez que a Ser126 substituiu a treonina do “TAXH” e há a mudança conservativa de Gln para Asp. Já na MtLPMO10, este par é Asp71-Ala129, ou seja, um resíduo polar (aspartato) substituiu a glutamina e um resíduo hidrofóbico (alanina) substituiu o resíduo polar treonina, sendo que este par não ocorre na Tma12, na CbpD, na ScLPMO10D ou na SmAA10A.

Na SmAA10A, o par Glu60-Asn185 (estrelas verdes na Figura 9) é importante na atividade catalítica pois se posiciona num túnel de acesso formado na interface de ligação entre a enzima e a quitina cristalina e pode mudar de conformação, abrindo ou fechando o acesso do túnel (BISSARO et al., 2018). Esse túnel seria importante ao impedir a passagem de moléculas maiores para o centro de cobre, porém, permitiria a passagem de moléculas pequenas como o O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cosubstratos) o que é fortalecido por estudos de mutagênese que mostram uma redução drástica no efeito quitinolítico na SmAA10A ao mutar a Glu60 (VAAJE-KOLSTAD et al., 2005; BISSARO et al., 2020). Na CbpD, esse par encontra-se invertido, nos resíduos Asn71-Glu199 (DADE et al., 2022), os quais são conservados tanto na MtLPMO10 (Asn76-Glu211) quanto na Tma12 (Asn70-Glu196).

#### 4.3 MODELAGEM

Para obtenção da estrutura tridimensional da putativa LPMO cianobacteriana, foram utilizadas diferentes ferramentas de modelagem por homologia, modelagem *de novo* e abordagens híbridas (Tabela 2). O RoseTTAfold entregou a maior percentagem de resíduos na região favorável do gráfico de Ramachandran (o qual plota os ângulos de torção das regiões de ligação entre aminoácidos), com 96,8%. Em seguida, o AlphaFold2 apresentou 95,7% de resíduos na região favorável. O Verify3D, que determina a compatibilidade do modelo atômico 3D com a sua própria sequência de aminoácidos (chamado de perfil 3D/1D), mostrou uma maior percentagem de aminoácidos no modelo obtido pelo Modeller com único template (neste caso o template foi a Tma12), com 97,9% de aminoácidos, seguido do modelo do Phyre2 (90,5%), Swiss-Model (90,1%) e AlphaFold2 (90,0%), estes três últimos bem próximos um do outro.

Tabela 2: Avaliação da qualidade de modelos tridimensionais da MtLPMO10 obtidos. Modeller single utiliza um alinhamento com único *template* para modelagem por homologia. Modeller Multiple utiliza alinhamento com múltiplos *templates* para tentar melhorar a qualidade final do modelo obtido.

Ferramenta	Template	Ramachandran	Verify3D	QMEAN4
Phyre2	7zjbB; 6if7A; 7sqxA	92,6%	90,5%	-1,77
RoseTTAfold	--	96,8%	86,8%	0,16

AlphaFold2	--	95,7%	90,0%	0,05
Modeller Single	6if7A	92,6%	97,9%	-2,64
Modeller Multiple	6if7A; 8c5nA; 7zjb; 5uizA	94,7%	89,4%	-2,71
Swiss-Model	6if7A	94,2%	90,1%	-1,68
I-Tasser	--	69,7%	89,5%	-7,69
Objetivo:	--	>95%	80% dos AAs com escore médio $\geq$ 0,1	Abs (Z-score) < 2

Em relação ao QMEAN, que combina linearmente potenciais estatísticos e termos de concordância entre os padrões estruturais e as predições com base na sequência de AA, o modelo obtido pelo AlphaFold2 foi próximo a zero (0,05), seguido do RoseTTAfold com escore absoluto de 0,16. O RMDS entre os modelos AlphaFold2 e RoseTTAfold foi 1,037 Å, sendo bem próximos estruturalmente. Desta forma, o modelo obtido do AlphaFold2 foi escolhido devido ao melhor QMEAN e valores aceitáveis de resíduos na região favorável e no Verify3D.

O modelo tridimensional predito possui duas folhas beta formando um domínio similar à imunoglobulina, sendo a primeira folha composta pelas fitas  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 6$  e a segunda composta pelas fitas  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 7$  e  $\beta 8$ , além de uma região relativamente plana onde se localiza o centro catalítico com um íon cobre (Figura 10). A existência de domínio com fitas beta antiparalelas é uma característica estrutural marcante das LPMOs (VAAJE-KOLSTAD et al., 2017; VANDHANA et al., 2022). Outra característica estrutural comum é a existência da região L2 entre a primeira e a segunda fitas beta, com pequenas  $\alpha$ -hélices intercaladas (delimitado na Figura 10 por setas verdes).

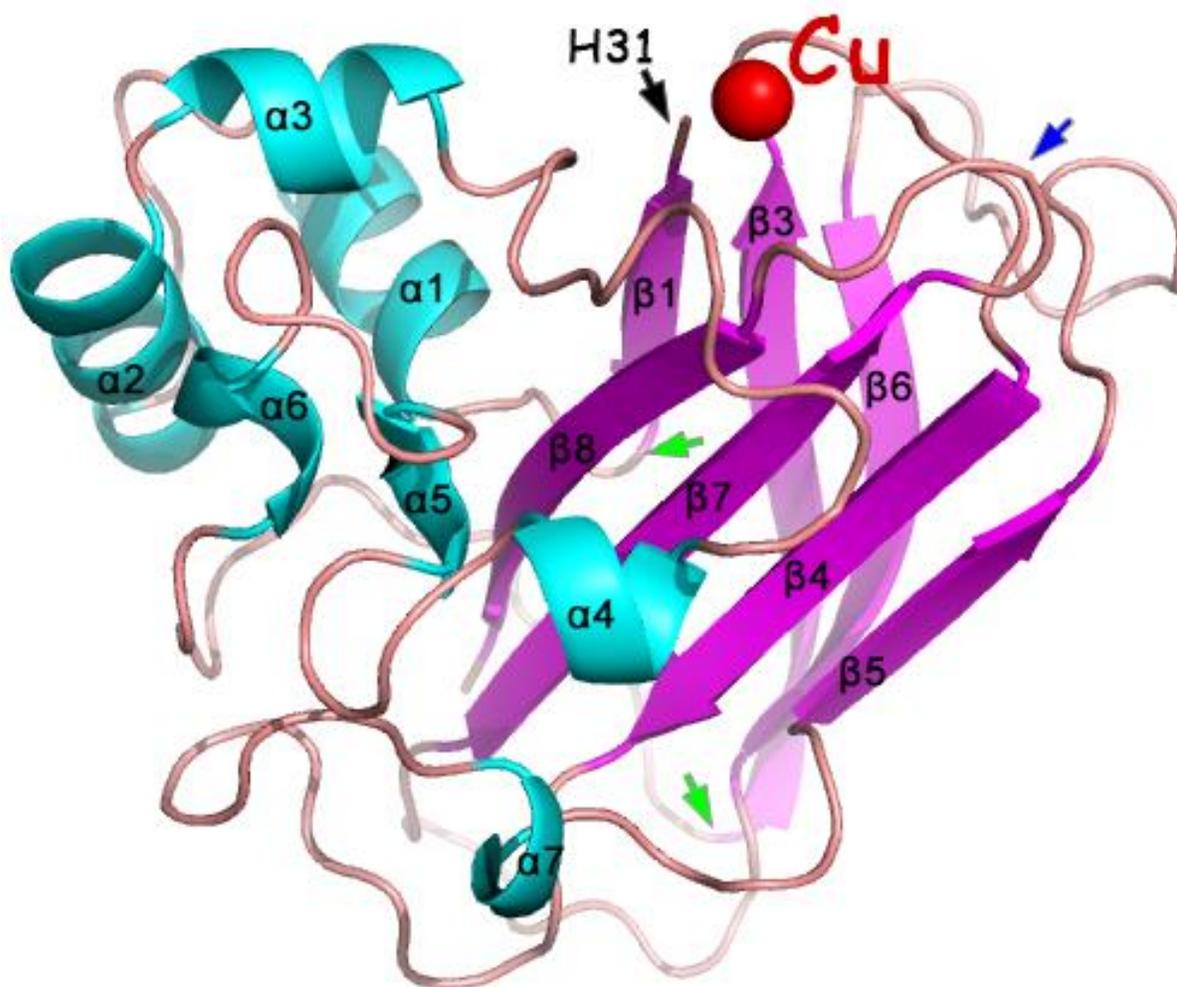


Figura 10: Visão geral do modelo putativo tridimensional da MtLPMO10. O modelo é colorido segundo suas estruturas secundárias: alfa hélices em ciano, fitas-beta em rosa e loops em laranja. Em vermelho é exibido o cobre do centro catalítico, posicionado segundo as coordenadas tridimensionais na Tma12 após alinhamento estrutural com a MtLPMO10. A seta preta indica a primeira histidina da proteína funcional, que participa da coordenação do centro de cobre. As setas verdes delimitam o longo loop existente entre a primeira e a segunda fitas-beta. A seta azul indica três regiões de loop na superfície próxima ao centro de cobre.

O modelo obtido previu seis  $\alpha$ -hélices intercaladas nesse *loop*. Outros três *loops* ocorreram entre fitas beta próximas ao centro de cobre, entre os resíduos Ala129-Val134, Gly168-Gly180, Ser207-Glu211 (seta azul). O modelo possui duas pontes dissulfeto, uma na posição Cys94-Cys216 e outra em Cys44-Cys57.

Ao buscar sequências com pelo menos 40% de identidade com a MtLPMO10, obteve-se 487 sequências no BLASTp-RefSeq. Entre os resíduos altamente conservados, um total de 24 resíduos tinham consenso de 100% (Figura 11). Observa-se que seis destes resíduos estão na região em que se encontra exposto o centro de cobre: Tyr70, Trp72, His132 (da braçadeira), Arg206, Ser209 e Glu211. A Phe213, que participa da esfera secundária de coordenação do metal, também é 100% conservada nas sequências. A histidina 31, N-terminal, teve correspondências em 485 das sequências (99,4%). Além disso, as cisteínas 57, 94 e 216 são 100% conservadas, refletindo sua importância para manutenção da estrutura tridimensional das proteínas similares à MtLPMO10.

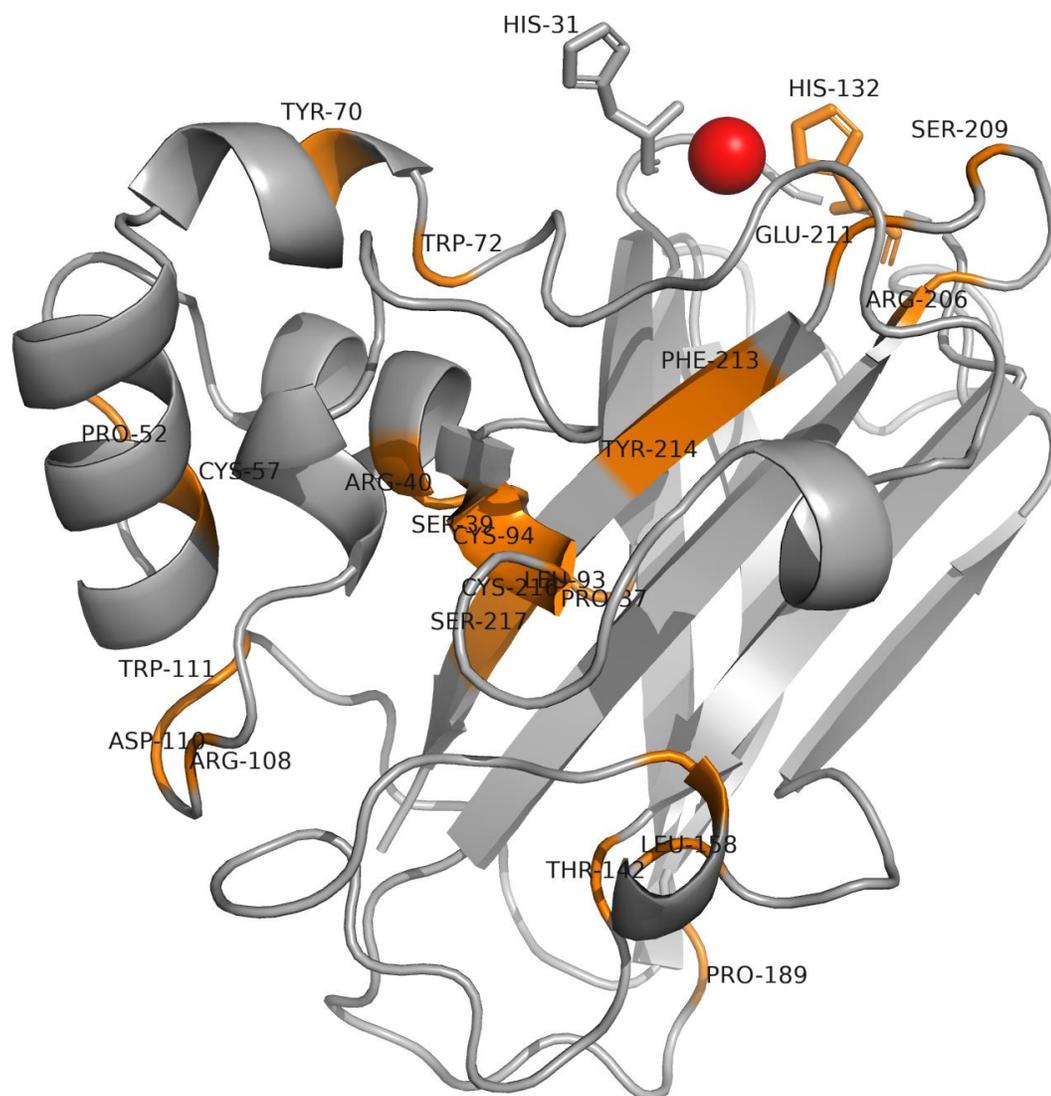


Figura 11: Padrão de conservação de resíduos da MtLPMO10. Em laranja são exibidos os resíduos altamente conservados com base no alinhamento múltiplo de seqüências com outras 487 seqüências que compartilham 40% ou mais de identidade com a MtLPMO10, resultado de busca no BLASTp-RefSeq. Em vermelho é exibido o cobre do centro catalítico, posicionado segundo as coordenadas tridimensionais do PDB 6IF7 após alinhamento estrutural com a MtLPMO10. As histidinas da braçadeira são exibidas em bastão.

Observou-se notável concordância estrutural entre a MtLPMO10 e as três proteínas mencionadas na Figura 9, as quais correspondem às estruturas de maior similaridade de seqüências dentre as depositadas no PDB. A Figura 12 ilustra a sobreposição estrutural entre elas. A de menor RMSD em relação à MtLPMO10 foi a Tma12 (RMSD = 0,728), que também teve maior identidade de seqüências (52,11%), seguida pela ScLPMO10D, com RMSD = 0,787 e, então a CbpD, com RMSD = 1,010.

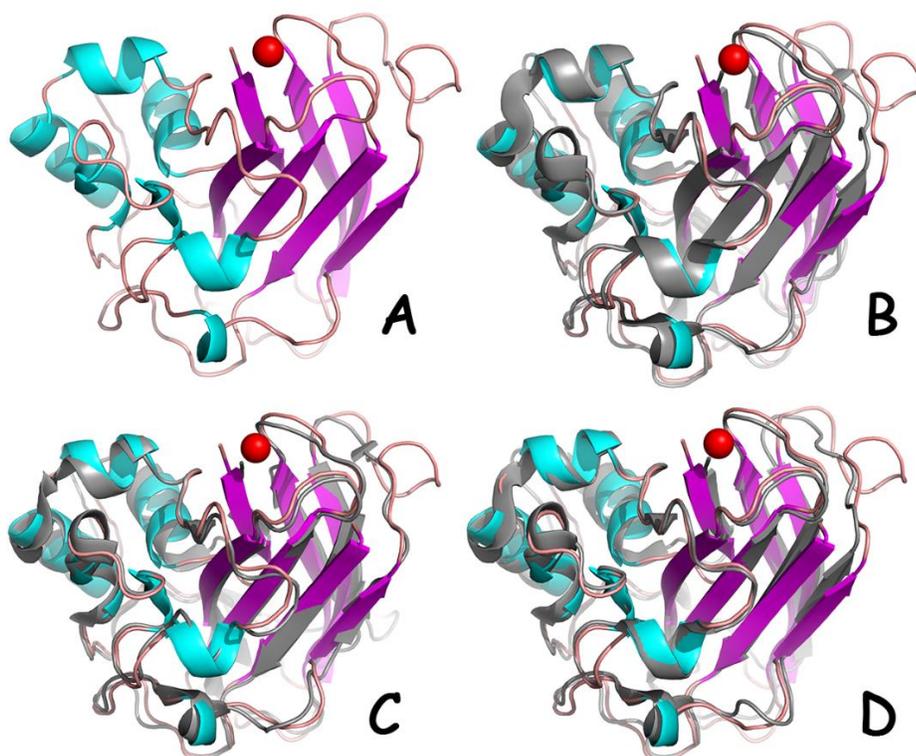


Figura 12: Sobreposição estrutural da MtLPMO10 com as três estruturas encontradas com maior identidade de seqüências. A) Modelo putativo da MtLPMO10 (em vermelho é exibido o cobre do centro catalítico, posicionado segundo as coordenadas tridimensionais da Tma12). B) Em cinza é

exibida a estrutura tridimensional da Tma12 (PDB ID 6IF7), alinhada com a MtLPMO10 com RMSD = 0,728. C) Em cinza é exibida a estrutura tridimensional do CbpD (8C5N), alinhada com a MtLPMO10 com RMSD = 1,010. D) Em cinza é exibida a estrutura tridimensional da ScLPMO10D (7ZJB), alinhada com a MtLPMO10 com RMSD = 0,787.

A sobreposição de estruturas da MtLPMO10 com as coordenadas tridimensionais da Tma12 permitiu identificar a correspondência entre os resíduos próximos do centro catalítico da Tma12 e os resíduos do provável centro catalítico na MtLPMO10. Os resíduos a pelo menos 5 Å do centro de cobre na Tma12 (Figura 13, em laranja) são His25, His127, Ala125, Phe198, Glu196 e Arg191, que na MtLPMO10 (Figura 13, em verde) correspondem à His31, His132, Thr130, Phe213, Glu211 e Arg206, respectivamente. Logo, o alinhamento tridimensional reforça que a braçadeira de histidinas da MtLPMO10 é formada pelos resíduos His31 e His132.

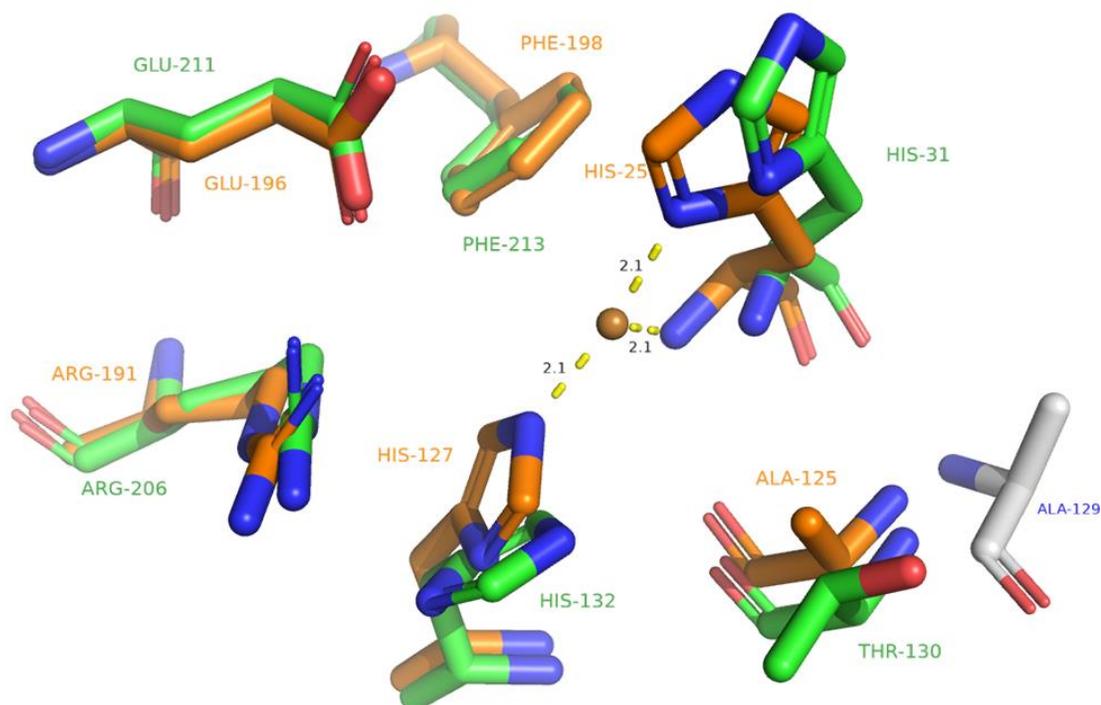


Figura 13: Sítio de ligação ao cobre na MtLPMO10. Em verde são exibidos os resíduos a 5 Å de distância do centro catalítico da MtLPMO10 (em verde) e da Tma12 (em laranja). O cobre da Tma12 é exibido como esfera. As linhas amarelas indicam a distância do centro metálico para os três nitrogênios da braçadeira de

histidina da Tma12. A Ala129, vizinha à Thr130 na MtLPMO10, embora mais afastada do cobre, é exibida para referência, em bastões brancos.

Na Tma12, o cobre é equidistante em 2,1 Å dos três nitrogênios que compõem a esfera primária de coordenação do metal: Nam (nitrogênio do grupo amino N-terminal), do N $\delta$  (nitrogênio do anel imidazólico) na His25 da Tma12 e do N $\epsilon$  (nitrogênio do anel imidazólico) da His-127. Eles formam uma estrutura em “T”, que é característica do centro catalítico das LPMOs. A distância entre o N $\delta$  e o N $\epsilon$  na MtLPMO10A foi de 6,3 Å, resultando numa distância esperada do cobre a esses nitrogênios de cerca de 3,15 Å ao desconsiderar a interação com o Nam.

Participando da esfera secundária de coordenação do cobre na Tma12 está a Phe198 e a Ala125, sendo que a Phe213 e a Thr130 são os respectivos homólogos na MtLPMO10. Ou seja, a MtLPMO10 exibe uma substituição importante do resíduo hidrofóbico alanina para o resíduo polar treonina (evidenciado no alinhamento múltiplo, em fundo verde na Figura 9), sendo que essa alteração não ocorre na Tma12, na CbpD, na ScLPMO10D ou na SmAA10A. Apesar disso, a Ala129 na MtLPMO10 ocorre próxima à Thr130, embora mais distante do íon metálico (Figura 13, em bastões brancos).

A esfera de coordenação secundária das LPMOs ajuda a estruturar o centro catalítico da enzima e a controlar o acesso de co-substratos. Uma fenilalanina e uma alanina, altamente conservadas nas AA10s, seriam importantes neste sentido, com a alanina em especial bloqueando o acesso ao solvente na posição axial à enzima complexada com o carboidrato cristalino e aumentando a chance de ativação de um oxigênio confinado na esfera de coordenação do cobre (FORSBERG et al., 2014; DADE et al., 2022).

#### 4.4 DINÂMICA MOLECULAR

O modelo tridimensional da MtLPMO10 foi submetido à dinâmica molecular, para verificar, *in silico*, a afinidade do complexo proteína-ligante em meio aquoso. A conformação inicial da enzima com seus ligantes prováveis (quitina e celulose) foi obtida por docagem manual, posicionando-se os carboidratos próximos aos resíduos correspondentes àqueles provavelmente importantes na interação proteína-ligante, como descrito na seção material e métodos.

Os resultados da simulação entre a MtLPMO10 e quitina indicaram que a enzima pode ligar-se de forma relativamente estável ao ligante. Após 100 ns de simulação, a distância entre o

cobre e o hidrogênio ligado ao carbono C1 (hidrogênio H1) foi de 8,2 Å e a distância até o hidrogênio ligado ao carbono C4 (hidrogênio H4) foi de 6 Å, sugerindo que o alvo mais provável da reação de oxirredução mediada pelo cobre é o hidrogênio ligado ao carbono C4, mais próximo do metal (Figura 14). Além disso, os nitrogênios da esfera de coordenação primária do metal ficaram mais próximos em comparação ao modelo inicial (Figura 13), sugerindo um centro mais compacto no sistema em equilíbrio com o ligante. Neste caso, o cobre ficou equidistante dos três nitrogênios em 1,9 Å e a Phe213 ficou a 4,1 Å de distância do metal.

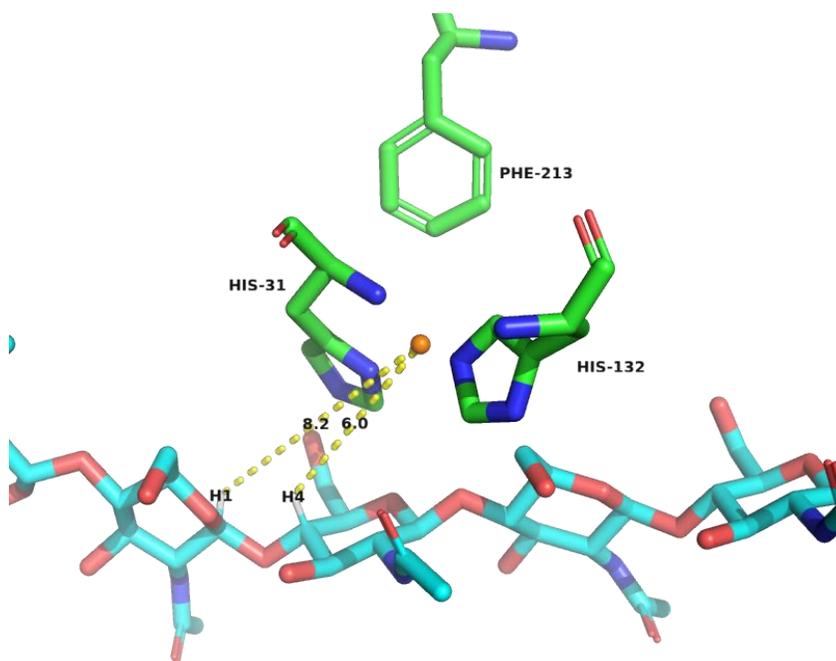


Figura 14: Visão das distâncias entre o Cu(I), o hidrogênio H1 (ligado ao carbono C1 da ligação glicosídica) e o hidrogênio H4 (ligado ao carbono C4) após 100 ns de dinâmica molecular.

Na DM da MtLPMO10 complexada à quitina, a distância média entre o Cu(I) e o H4 no decorrer da simulação foi  $6,0 \pm 0,7$  Å, e a distância média entre o Cu(I) e o H1 foi  $7,9 \pm 0,7$  Å (Figura 15, em triplicata), ou seja, maior que a distância Cu(I)-H4. Isso sugere uma regioesletividade do tipo C4 para a MtLPMO10, como a estabelecida para a Tma12, proteína com a qual compartilha maior identidade de sequências e estrutural.

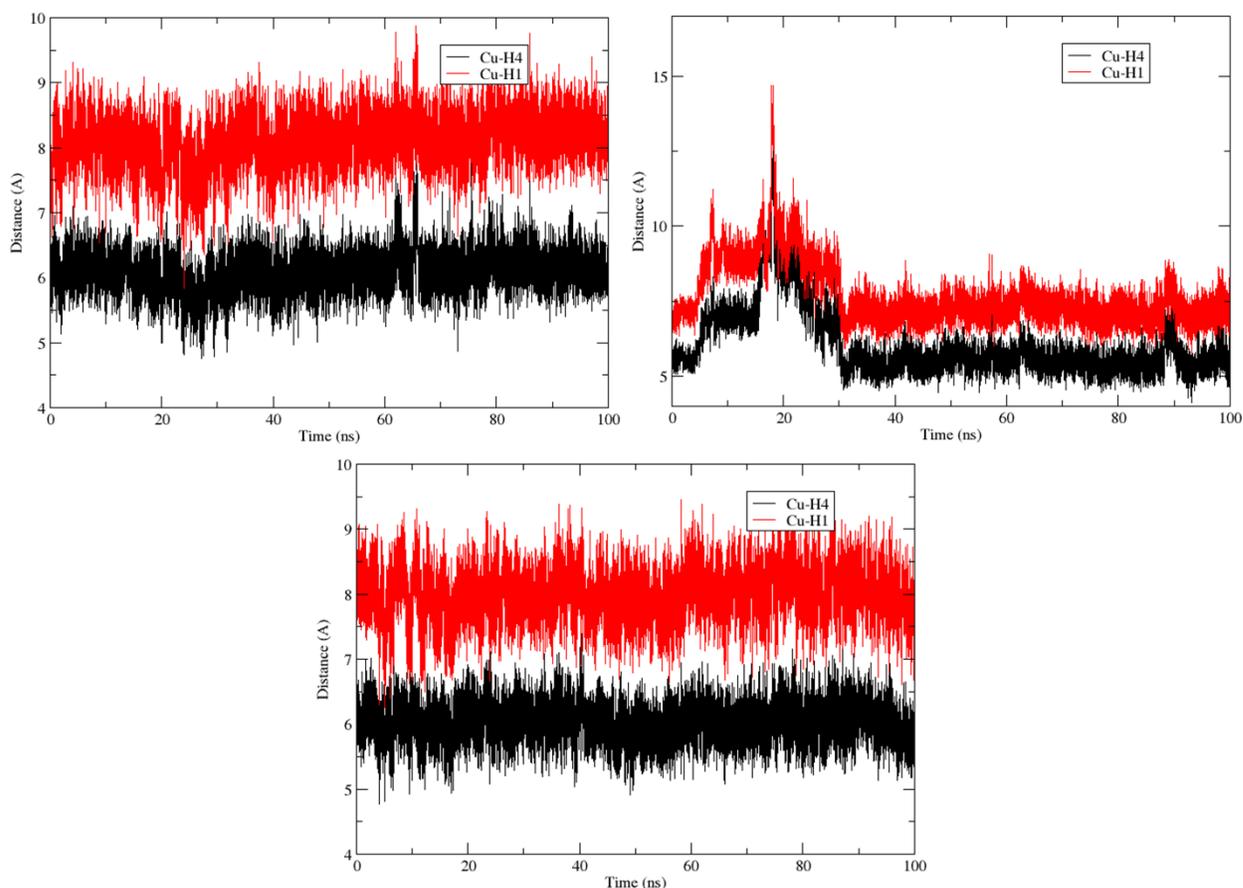


Figura 15: Distâncias, no decorrer de 100 ns de simulação de DM da MtLPMO10 com quitina, entre o Cu(I), o hidrogênio H1 mais próximo (ligado ao carbono C1 da ligação glicosídica) e o hidrogênio H4 (ligado ao carbono C4). Cada gráfico representa uma réplica do experimento.

Na DM da SmAA10A com quitohexaose, utilizada como controle, houve um período inicial de cerca de 35 ns com uma variação maior da distância tanto Cu(I)-H1 quanto Cu(I)-H4, período a partir do qual a interação proteína-ligante se estabilizou, até que a distância Cu(I)-H1 tornou-se menor que a distância Cu(I)-H4 até o final dos 100 ns, o que é compatível com a regioesletividade do tipo C1, já estabelecida para a SmAA10A (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010; BISSARO et al., 2018). Neste caso, a distância média Cu(I)-H1 de 35 ns a 100 ns foi  $4,7 \pm 0,3$  Å, enquanto a distância média Cu(I)-H4 no mesmo período foi  $6,2 \pm 0,3$  Å. Na DM da MtLPMO10 com a celoheptaose, o ligante desviou para longe do sítio de ligação a partir dos 30 ns (dados não mostrados).

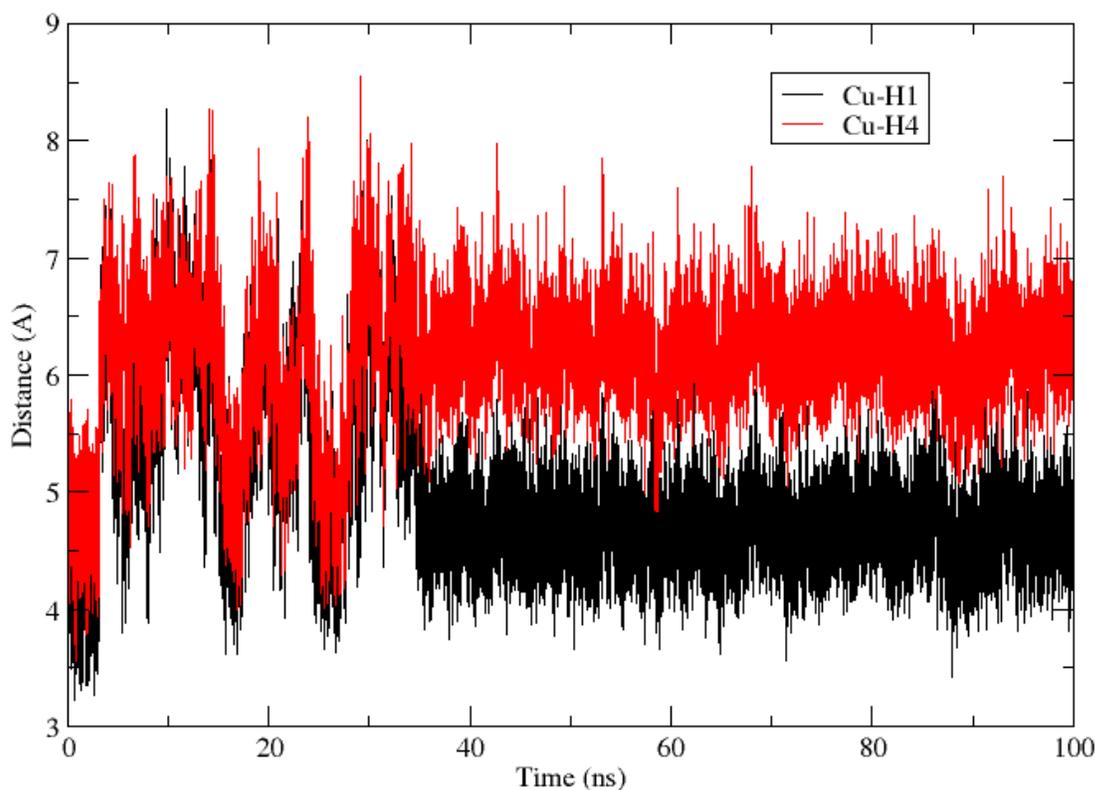


Figura 16: Distâncias, no decorrer de 100 ns de simulação de DM da SmAA10A com quitohexaose, entre o Cu(I), o hidrogênio H1 mais próximo (ligado ao carbono C1 da ligação glicosídica) e o hidrogênio H4 (ligado ao carbono C4).

O RMSD da proteína e do ligante é exibido na Figura 17. Observou-se pouca variação na estrutura geral da enzima durante a dinâmica molecular (em preto, RMSD com média  $1,2 \pm 0,1 \text{ \AA}$  em triplicata), enquanto houve variação maior na conformação do ligante (em vermelho, média  $2,5 \pm 0,6 \text{ \AA}$  em triplicata), o que é esperado por ser uma cadeia oligossacarídica relativamente longa (oito unidades) sem restrições de rotação nas ligações glicosídicas que unem os monômeros de N-acetilglicosamina. Por outro lado, a SmAA10A permaneceu comparativamente mais estável no decorrer da DM, com RMSD abaixo de  $1 \text{ \AA}$  (média  $0,8 \pm 0,1 \text{ \AA}$ ), enquanto o ligante teve maior RMSD em relação à proteína (média  $1,7 \pm 0,2 \text{ \AA}$ , Figura 18).

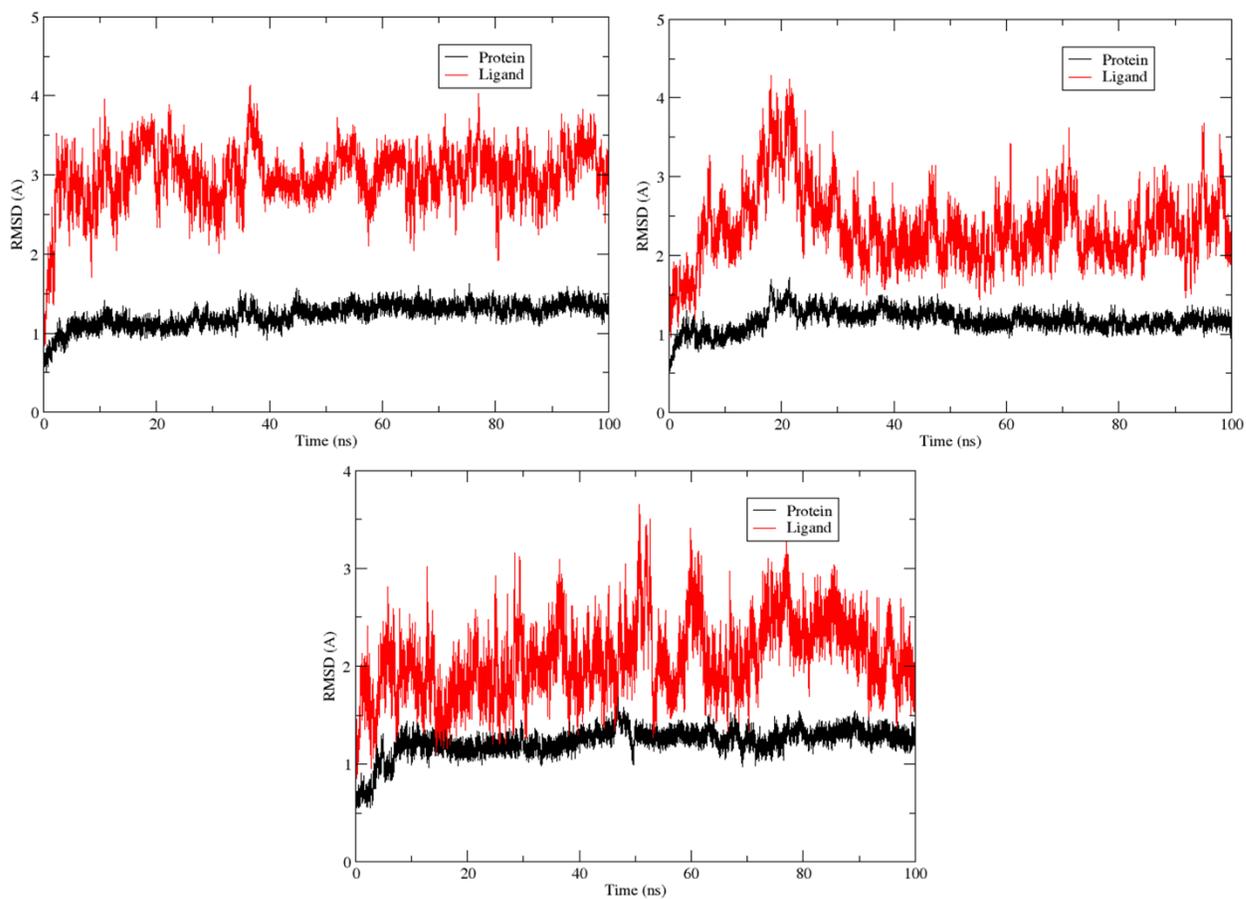


Figura 17: Distâncias médias quadráticas (RMSD) da proteína (MtLPMO10) e do ligante (quitina) no decorrer de 100 ns de simulação. Cada gráfico representa uma réplica do experimento.

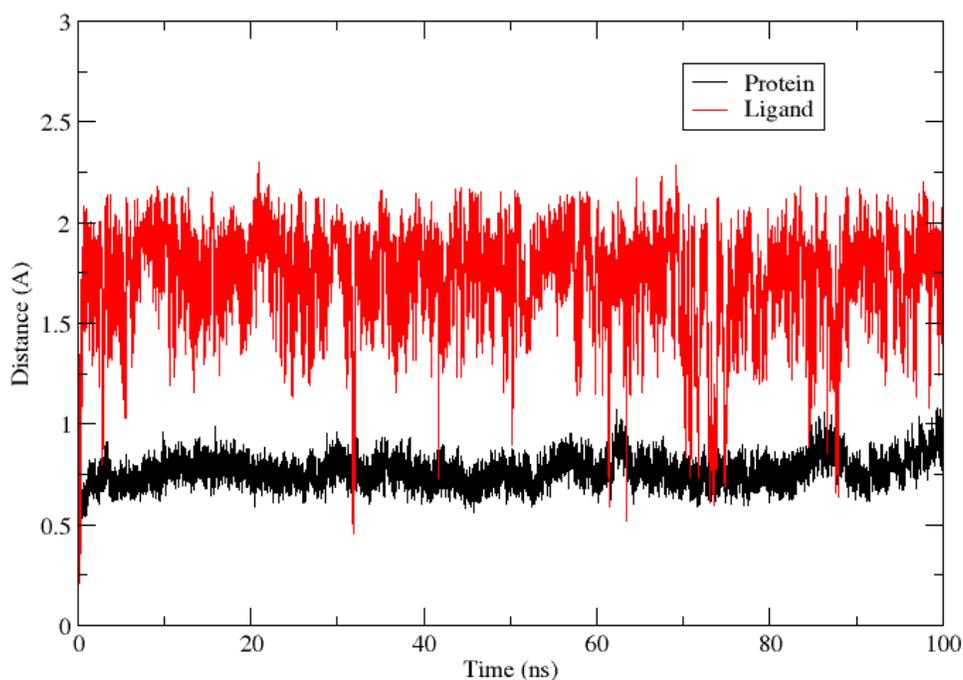


Figura 18: Distâncias médias quadráticas (RMSD) da proteína (SmAA10A) e do ligante (quitohexaose) no decorrer de 100 ns de simulação.

A flutuação média quadrática (RMSF, do inglês *Root Mean Square Fluctuation*) ficou abaixo de 1 Å na maioria dos resíduos (Figura 19). No entanto, uma região de loop variou bastante durante a simulação, correspondendo aos resíduos Gln167 ao Gly180. Essa região se encontra fora da região de contato com o ligante.

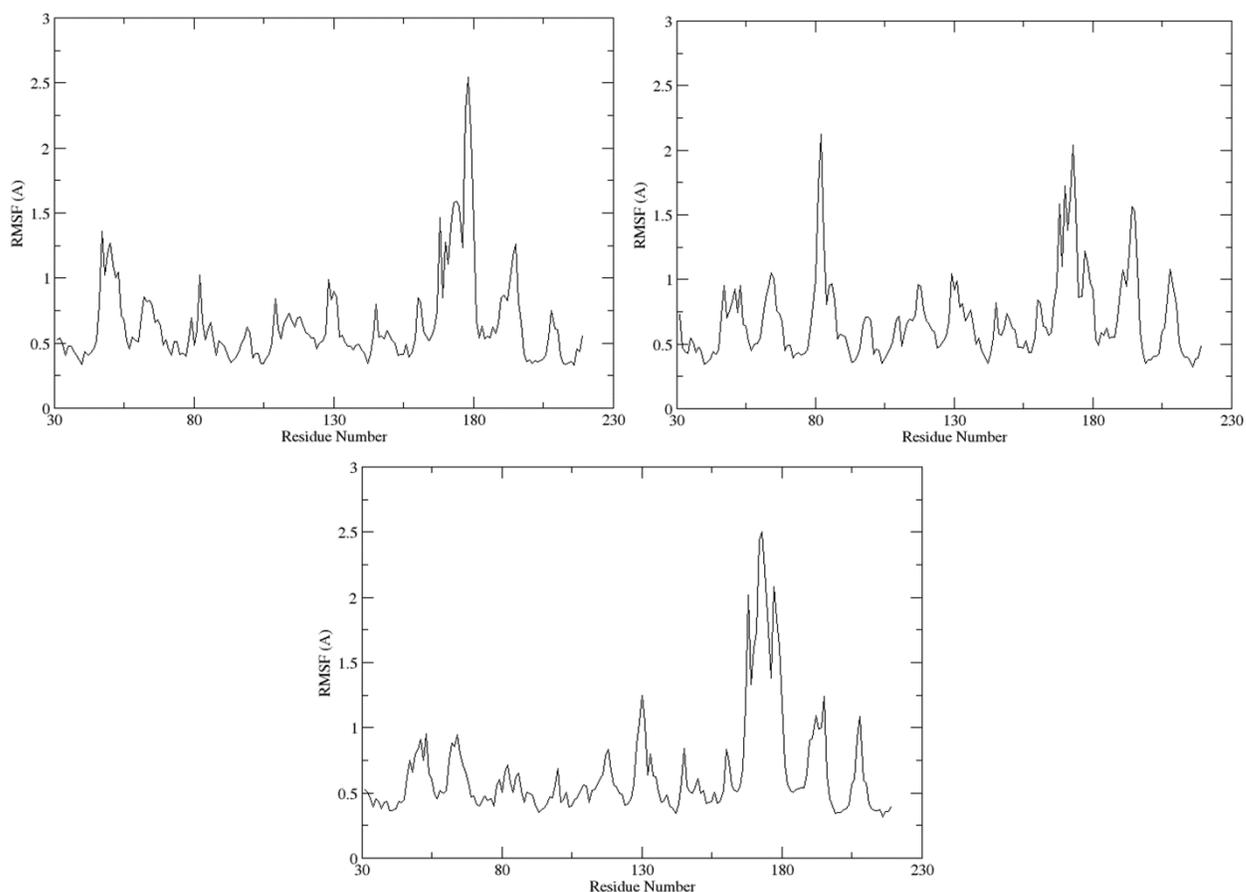


Figura 19: RMSF da MtLPMO10 no decorrer de 100 ns de simulação. Cada gráfico representa uma réplica do experimento.

A decomposição de energia dos resíduos entre os estados ligado e não-ligado à quitina permitiu avaliar a contribuição dos resíduos da proteína, de forma que, quanto menor a energia média, mais o respectivo resíduo contribuiu com a interação ao ligante. Encontrou-se maior importância dos resíduos 206 (arginina,  $-5,4$  kcal/mol) e 70 (uma tirosina com  $-4,1$  kcal/mol) (Figura 20). O ligante arranhou-se em uma trilha na superfície da MtLPMO10, a qual se estendeu da Asn48 até a Leu208 (Figura 21). Dos três principais resíduos encontrados, a Arg206 interagiu principalmente no subsítio +2, a histidina 31 da braçadeira, no terminal N, foi a segunda mais importante, interagindo com o subsítio +1 e a Tyr70 foi a mais importante entre os subsítios negativos (-3).

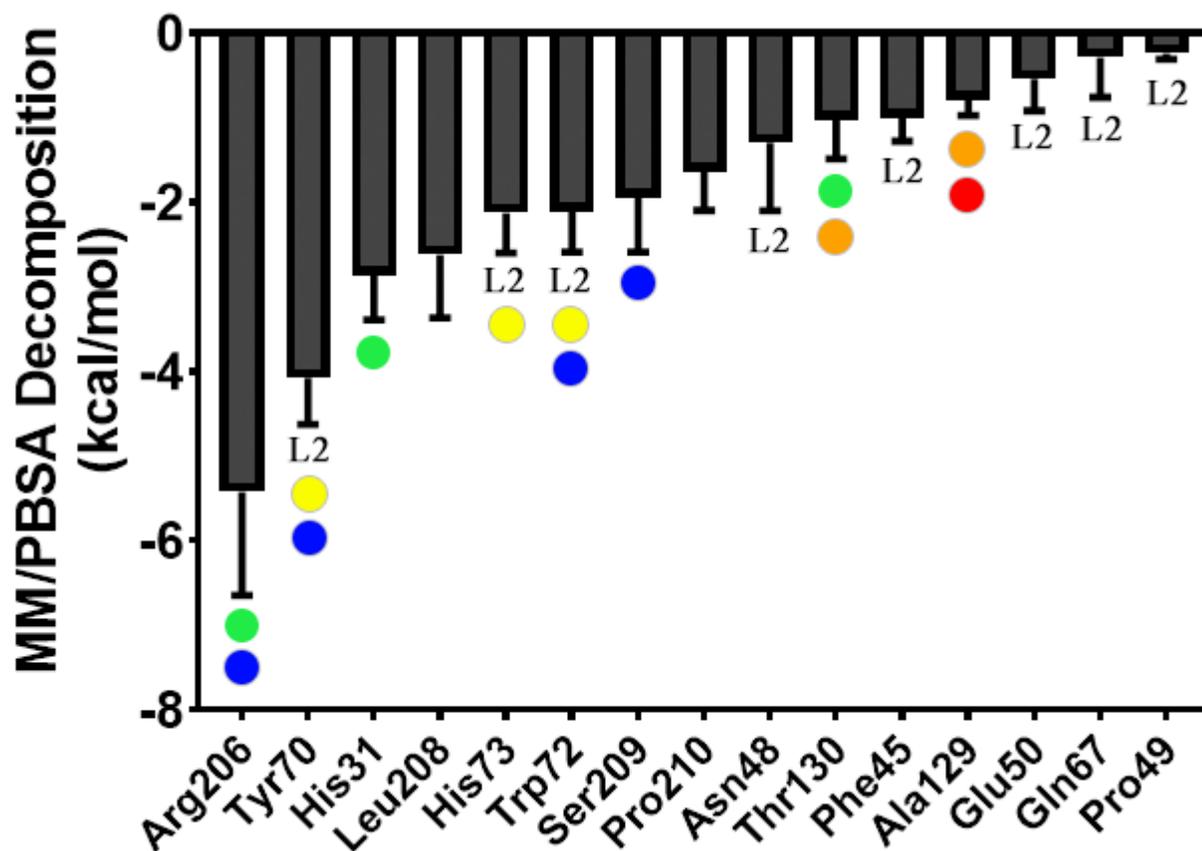


Figura 20: Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 15 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante em 100 ns de DM. L2: resíduos do loop L2. Bolas verdes: resíduos a uma distância de até 5 Å do cobre. Bolas laranja: resíduos do padrão “TAXH”. Bola vermelha: resíduo que participa do par de reconhecimento de quitina. Bolas amarelas: resíduos da sequência consenso “Y(W)EPQSVE”. Bolas azuis: resíduos 100% conservados entre 487 sequências similares (Figura 11).

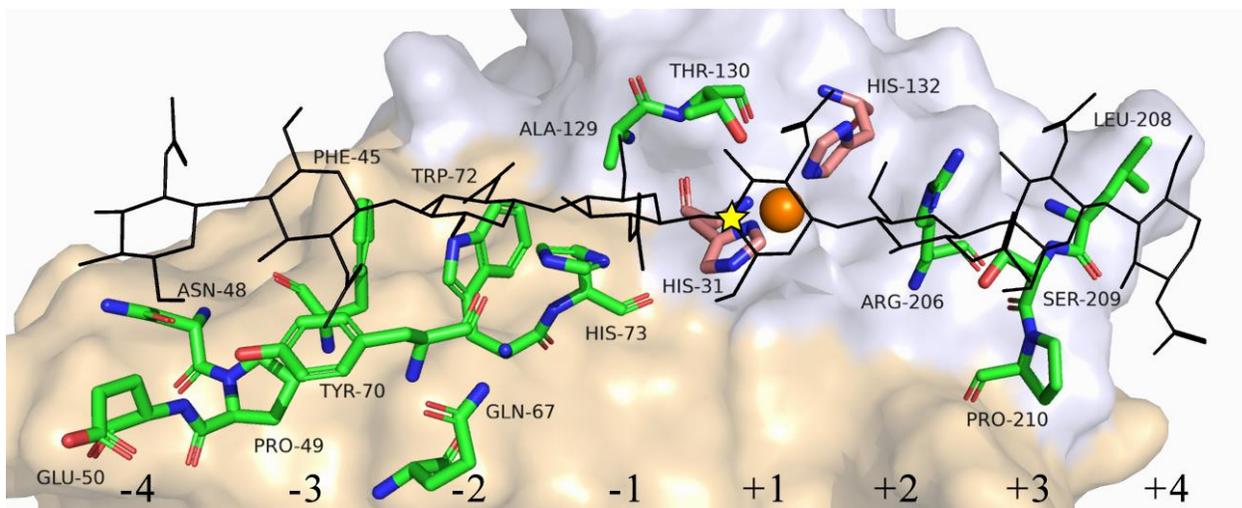


Figura 21: Disposição tridimensional dos 15 principais resíduos em interação com o ligante, obtidos pela decomposição de energias (MM/PBSA). A superfície da MtLPMO10 é exibida em branco, ao fundo, com a região L2 colorida em amarelo. As histidinas da braçadeira são exibidas em rosa. O ligante é mostrado em linhas pretas e os seus monômeros são numerados em subsítios a partir do local provável de quebra da ligação glicosídica (marcado como estrela amarela), de -4 a +4, com números positivos em direção ao terminal redutor e negativos em direção ao terminal não redutor do ligante, como praticado no estudo de hidrolases (SUNNA et al., 1997; BISSARO et al., 2018). O cobre é representado como esfera metálica.

Além disso, dois resíduos do padrão de reconhecimento de quitina “TAXH” (Figura 9) estiveram entre os 15 mais importantes na decomposição de energia (Figura 20): Ala129 e Thr130. Também, três resíduos da sequência consenso “YDWXXVN” (em fundo amarelo na Figura 9) estiveram entre os 15 mais importantes: Tyr70, Trp72 e His73. Já a Arg206, que obteve menor valor médio de energia livre, é 100% conservada entre 487 sequências que possuem pelo menos 40% de identidade com a MtLPMO10 (Figura 11), similar à Tyr70, Trp72 e Ser209, as quais são também 100% conservadas.

É possível identificar resíduos-chaves na interação LPMO-quitina ao mapear homólogos de outras LPMOs quitinolíticas, encontrados seja em estudos de mutagênese (VAAJE-KOLSTAD et al., 2005), Ressonância Nuclear Magnética (AACHMANN et al., 2012) ou simulações de DM (BISSARO et al., 2018). Na SmAA10A, é estabelecido que a superfície de interação com a quitina se estende desde a Tyr54, passando pelas histidinas da braçadeira (His28 e His114), até a Asp198 (Figura 22E). Na MtLPMO10, este caminho homólogo se estende da Tyr70 até a Ser209/Leu208

(Figura 22A). A Tyr70 e a Ser209 são 100% conservadas entre 487 sequências de identidade  $\geq$  40%, mas não a Leu208 (Figura 11). Em relação às estruturas de interesse, a Leu208 ocorre apenas na MtLPMO10 (Figura 9 e Figura 22), já a Ser209 é conservada em todas as estruturas exceto na SmAA10A, a qual possui outro resíduo polar neste ponto (Thr183, Figura 22E). Apesar destas variações, tanto a Leu208 quanto a Ser209 foram resíduos importantes na DM, sugerindo um papel relevante deste par na interação enzima-substrato.

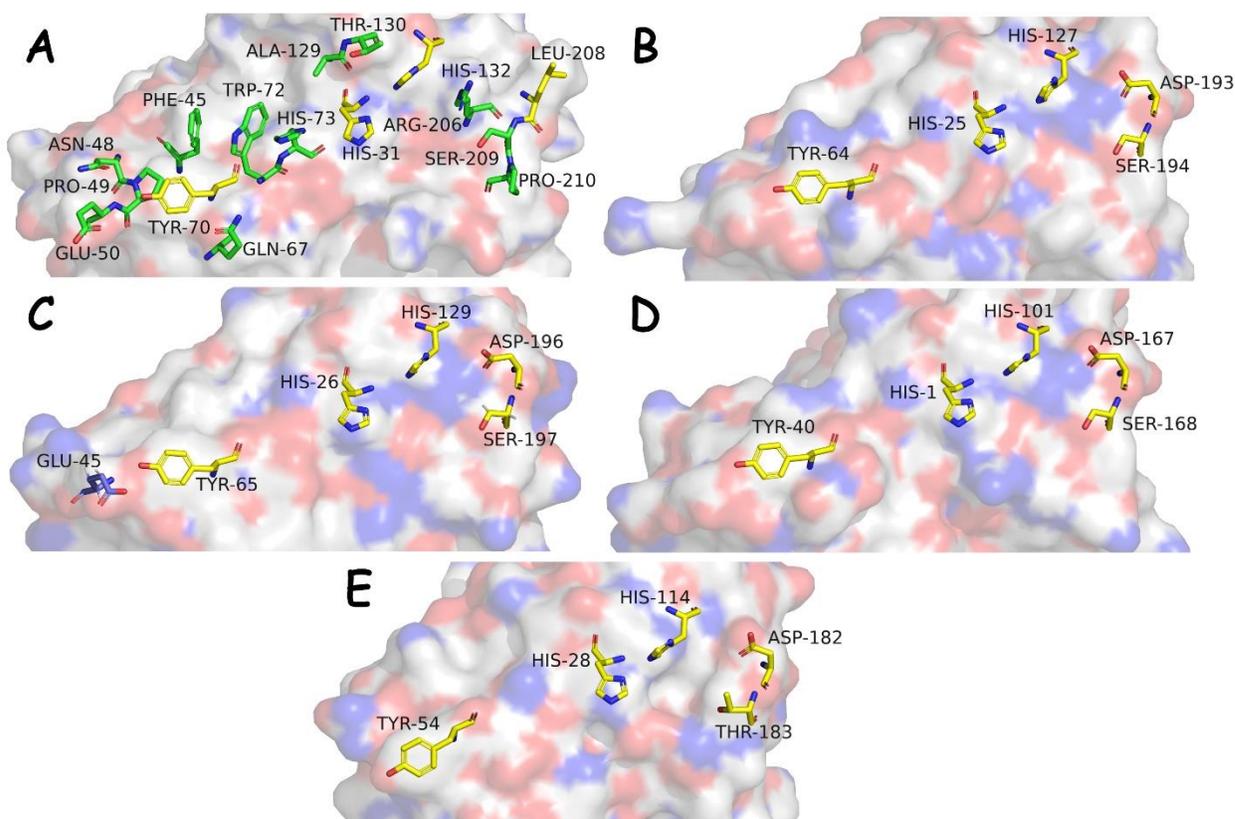


Figura 22: Disposição tridimensional dos resíduos chave na interação com o substrato. Em amarelo são exibidos os resíduos de interesse. Estes foram identificados com base em estudos de mutagênese, computacionais e Ressonância Nuclear Magnética sobre a SmAA10A, com a sobreposição estrutural das enzimas para identificar os respectivos homólogos. A) MtLPMO10, onde são também exibidos outros resíduos importantes na DM neste estudo, em cor verde. B) Tma12 (PDB ID 6IF7). C) CbpD (PDB 8C5N), em azul à esquerda está o Glu45, que estende a superfície de ligação à quitina. D) ScLPMO10D (PDB 7ZJB). E) SmAA10A (PDB 2BEM).

Interessantemente, a Tyr70 foi o principal resíduo em interação com o substrato nos subsítios negativos pelo método MM/PBSA. É estabelecido que o homólogo Tyr54 na SmAA10A é essencial na interação com a quitina cristalina (VAAJE-KOLSTAD et al., 2005; AACHMANN et al., 2012; BISSARO et al., 2018), e seria esperado que a Tyr70 tivesse um papel relevante também na MtLPMO10A, como observado. Além disso, dois outros resíduos aromáticos próximos foram relevantes na interação com os subsítios negativos do ligante: a Phe45, afastada da Tyr70 em 5 Å e o Trp72, afastado em 7 Å (Figura 21 e Figura 22A). Observou-se também que, apesar da concomitância estrutural entre as tirosinas da MtLPMO10 e da SmAA10A, o alinhamento múltiplo de sequências sugeriu uma mudança de Tyr54 na SmAA10A para Trp72 na MtLPMO10 (Figura 9), apesar de que Trp72 e Tyr70 estão afastados estruturalmente na MtLPMO10. Ou seja, apesar de um resultado diverso no alinhamento múltiplo, a Tyr70 da MtLPMO10A é o homólogo mais provável da Tyr54 na SmAA10A. Além disso, o Trp72 ocorre em todas as sequências da Figura 9 exceto na SmAA10A, enquanto a Phe45 ocorre tanto na MtLPMO10 quanto na CbpD.

Outra interessante observação foi que, embora os resíduos da superfície de interação da SmAA10A com a quitina estendam-se da Tyr54 à Asp182 (Figura 22E), a área superficial de contato tanto na MtLPMO10 quanto na Tma12, na CbpD e na ScLPMO10D (Figura 22A-D) parece ser maior e, conforme notado por Dade et al. (2022), na CbpD poderia se estender até o resíduo Glu45 (exibido em azul na Figura 22C). O homólogo na MtLPMO10 é o Glu50, o qual foi importante na interação com o ligante ao interagir no subsítio -4 e possui homólogos na Tma12 e na ScLPMO10D (Figura 9). Logo, uma característica distintiva em relação à SmAA10A é uma maior superfície de contato com o ligante. Ademais, os valores médios, desvio padrão e erro da média de energia livre foram próximos entre os sistemas MtLPMO10-quitina e SmAA10A-quitina, tanto no método MM/PBSA quanto no MM/GBSA (Tabela 3).

Tabela 3: Cálculos de energia livre pelos métodos MM/PBSA e MM/GBSA nos sistemas finalizados na DM.

Complexo	MM/PBSA			MM/GBSA		
	Média	Desvio padrão	Erro Padrão	Média	Desvio padrão	Erro Padrão
MtLPMO10 + quitina (réplica 1)	-21,07	6,55	0,46	-27,6	4,28	0,30
MtLPMO10 + quitina (réplica 2)	-13,29	6,95	0,49	-35,57	6,67	0,47
MtLPMO10 + quitina (réplica 3)	-23,63	6,39	0,45	-41,19	4,16	0,29
SmAA10A + Quitohexaose	-21,11	5,85	0,41	-24,97	4,05	0,29

## 5 DISCUSSÃO

As LPMOs são enzimas acessórias que podem degradar polissacarídeos em sinergismo com enzimas hidrolases, aumentando a eficiência do processo de conversão de carboidratos complexos em açúcares (GUO et al., 2022). Elas catalisam a clivagem oxidativa da ligação glicosídica, em oposição à clivagem hidrolítica proporcionada por hidrolases. Tal sinergismo possibilita o processamento de polissacarídeos até então recalcitrantes química e fisicamente, como a celulose e a quitina (VAAJE-KOLSTAD et al., 2010; QUINLAN et al., 2011; FRANDSEN et al., 2016). Logo, as LPMOs têm sido exploradas devido às potenciais aplicações industriais, em especial na produção de biocombustíveis, com diversas patentes já concedidas (SOONG; SAUNDERS, 2011; JOHANSEN, 2016; KOETSIER et al., 2016; CHYLENSKI et al., 2019).

Embora a maioria das LPMOs caracterizadas até então sejam produzidas naturalmente por fungos, LPMOs de outros grupos taxonômicos têm sido relatadas, como LPMOs de uma nova família identificada no aparelho digestivo do inseto *Thermobia domestica* com papel na digestão de celulose sem assistência microbiana, e no remodelamento de quitina durante o desenvolvimento e metamorfose (SABBADIN et al., 2018; YADAV et al., 2019). Ou uma LPMO produzida por entomopoxvírus e que rompe a matriz peritrófica que protege o epitélio do intestino médio de insetos, aumentando a eficiência de bioinseticidas (CHIU et al., 2015). Ou a enzima quitinolítica NaLPMO10A produzida pela Archaea *Natrialbaceae archaeon* e que permanece estável em condições extremas (LI et al., 2022).

Nesta pesquisa, foi identificada uma provável LPMO da classe AA10 denominada MtLPMO10, uma proteína de 289 aminoácidos encontrada a partir da mineração do genoma da cianobactéria *Mastigocoleus testarum*. Ela possui tanto um domínio LPMO\_AA10 (acesso cd21177) quanto um domínio ChiA1\_BD (acesso cd12214, ambos mantidos pelo CDD/NCBI), sugerindo que a proteína possui afinidade por quitina como ligante e uma ação de enzima LPMO. A similaridade de sequência de resíduos com proteínas de outros grupos de bactérias, em especial dentro do Clado Terrabacteria (Filos Actinobacteriota e Firmicutes), porém não dentro do Filo Cianobacteriota, indica uma origem externa às cianobactérias, apontando para uma provável transferência interespecífica. No entanto, a história evolutiva da proteína precisa ser aprofundada em novos estudos.

A análise filogenética da MtLPMO10 com os módulos catalíticos de LPMOs já caracterizadas na classe AA10 do CAZY, incluindo membros da classe AA9 como grupo externo,

mostrou maior proximidade filogenética com a enzima Tma12 isolada da samambaia *Tectaria macrodonta* e que possui propriedades inseticidas (SHUKLA et al., 2016). Embora tanto a MtLPMO10 quanto a Tma12 estejam mais próximas filogeneticamente de outras LPMOs com atividade celulolíticas (Figura 8), a Tma12 é uma enzima quitinolítica, o que sugere também atividade quitinolítica da MtLPMO10.

As três proteínas de estruturas experimentais conhecidas (depositadas no PDB) e que compartilham pelo menos 40% de identidade de sequências com a MtLPMO10 são a Tma12 (identidade 52,11%), a CbpD (identidade 49,21%) e a ScLPMO10D (identidade 47,92%). As três possuem também alta concordância estrutural com a MtLPMO10 (Tma12 com RMSD = 0,728, CbpD = 0,787 e ScLPMO10D = 1,010). A maior concordância estrutural entre as três proteínas em comparação a uma menor identidade de sequências entre elas é um achado frequente no estudo das LPMOs, refletindo uma maior conservação estrutural do que uma conservação na sequências de resíduos de diferentes LPMOs (VAAJE-KOLSTAD et al., 2017).

A CbpD é uma proteína multidomínio, com os domínios AA10 e CBM, ambas com afinidade por quitina, além de um domínio GbpA2, o qual possui papel na virulência da bactéria *P. aeruginosa*, a qual é agente infeccioso nosocomial do sangue, trato urinário e pulmões em humanos (ASKARIAN et al., 2021). Embora humanos não produzam o polímero quitina, eles produzem mucina, uma proteína altamente glicosilada, cujos glicanos possuem diversos sacarídeos, cujas ligações glicosídicas incluem ligações  $\beta(1-4)$ , e estes sacarídeos poderiam mimetizar a quitina de forma imperfeita (CORFIELD, 2015). Outra possível função da CbpD na virulência da *P. aeruginosa* seria na interação com a parede celular fúngica (que contém quitina), em co-infecções com fungos patogênicos como *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*.

Já a ScLPMO10D é uma das sete LPMOs expressas pela bactéria *S. coelicolor* e é superexpressa durante o complexo processo de esporulação, quando a bactéria se diferencia de um estágio de vida vegetativo para um estágio reprodutivo (VAN DISSEL; CLAESSEN; VAN WEZEL, 2014). Além disso, devido ao seu atípico domínio de ancoramento à parede celular, especula-se que tenha função relacionada ao remodelamento da parede, a qual é composta de peptidoglicanos similares à quitina (os quais possuem cadeiras de N-acetilglicosaminas ligadas por ligações  $\beta(1-4)$ , intercaladas por Ácido N-acetilmurâmico também ligados por ligações  $\beta(1-4)$ ) (WALTER; SCHREMPF, 2008; ZHONG et al., 2022; VOTVIK et al., 2023). Logo, a ScLPMO10D estaria relacionada ao desenvolvimento da *S. coelicolor*. Dado que cianobactérias

possuem uma parede celular composta também de peptidoglicanos, a função da MtLPMO10 para a cianobactéria *Mastigocoleus testarum* poderia também estar relacionada à sua própria fisiologia.

A estrutura tridimensional da MtLPMO10, predita pelo servidor AlphaFold2, obteve um baixo valor absoluto de QMEAN4 (0,05), indicando uma qualidade estereoquímica de alta confiabilidade. Ela possui características estruturais comumente encontradas em LPMOs, como a existência de fitas beta antiparalelas em domínio similar à imunoglobulina, uma longa região de loop (região L2) entre  $\beta 1$  e  $\beta 2$  e um provável centro catalítico exposto ao solvente, composto da braçadeira de histidina (resíduos His31 e His132, sendo a primeira uma histidina N-terminal), além de uma fenilalanina (Phe213) na segunda esfera de coordenação do metal. A região L2 representa maior parte da superfície de contato com o ligante nas LPMOs e também possui a maior diversidade de resíduos, sendo em grande parte responsável pela especificidade ao substrato em diferentes enzimas (WU et al., 2013; FORSBERG et al., 2016; VAAJE-KOLSTAD et al., 2017). Já a braçadeira de histidina é conservada nas LPMOs conhecidas (VU; NGO, 2018) e um terceiro resíduo que ajuda a coordenar o íon metálico varia geralmente entre uma tirosina nas enzimas da classe AA9s e uma fenilalanina na classe AA10.

A presença, na MtLPMO10, de padrões comumente encontrados em LPMOs da classe AA10 reflete a conservação de propriedades estruturais, apesar de variações na sequência de aminoácidos em alguns desses padrões. A presença da Thr130 no lugar de uma alanina na esfera de coordenação secundária da MtLPMO10 aponta para um papel análogo, de bloqueio de acesso ao solvente no complexo com o substrato cristalino, considerando que a Thr130 foi o décimo resíduo mais importante na interação com o ligante na DM.

Além disso, a Ala129 ocorre numa posição equatorial próxima, porém, mais afastada do metal (Figura 13), e foi o 12º principal resíduo na DM. Essa substituição de um resíduo hidrofóbico por um resíduo polar na esfera de coordenação secundária é única considerando as LPMOs AA10 até então caracterizadas. Logo, seu significado precisa ser melhor explorado experimentalmente. Já a fenilalanina, conservada na MtLPMO10 (Phe213) têm sido demonstrada essencial para a atividade enzimática, com sua substituição resultando em completa ou parcial inativação das LPMOs (FORSBERG et al., 2014).

Além disso, o padrão de reconhecimento de quitina “TAXH” é alterado para “SAPH” na CbpD e “ATPH” na MtLPMO10, ou seja, o padrão na MtLPMO10 possui os dois primeiros resíduos invertidos. Já o par de reconhecimento de quitina Gln-Thr é alterado para Asp66-Ser126

na CbpD, para Asp71-Ala129 na MtLPMO10 e para Asp-Thr na Tma12 e na ScLPMO10D, ou seja, o padrão Gln-Thr é encontrado apenas na SmAA10A, enquanto a Tma12, a CbpD e a ScLPMO10D possuem substituições por outros resíduos polares, mas não aromáticos. Já o par de controle de acesso do túnel Glu60-Asn185 encontrado na SmAA10A, está invertido na MtLPMO10 (Asn76-Glu211), na CbpD (Asn71-Glu199) e na Tma12 (Asn70-Glu196), porém, essa permuta mantém o posicionamento do par Asn-Glu no domínio AA10 e o direcionamento na forma de túnel, apontando para o centro catalítico, logo, acredita-se que o par, mesmo que invertido, tenha uma função análoga à SmAA10A. Na região L2, há variações no consenso “Y(W)EPQSVE”, que na MtLPMO10 assume a forma “YDWHEVN”, similar às demais homólogas a ela. Em especial, os três resíduos do padrão (Tyr70-Trp72-His73) estiveram entre os mais importantes na DM, ao interagir com os subsítios negativos do ligante.

O padrão “WWW” da esfera de coordenação secundária, reportado como frequente em enzimas quitinolíticas de bactérias (BEESON et al., 2015), assume a conformação “YFW” na Tma12, CbpD e ScLPMO10D, sofrendo variações importantes, mas mantendo a aromaticidade do trio. O mesmo trio “YFW” é encontrado na enzima celulolítica SmLPMO10C (FORSBERG et al., 2014), ou seja, não é exclusiva de LPMOs quitinolíticas. Já na MtLPMO10, ocorre o padrão “YMW”, com um resíduo metionina hidrofóbica. Essas observações, juntamente à localização ao redor do centro catalítico e sem exposição à superfície sugerem que o padrão “WWW” não é determinante da especificidade por quitina, mas está envolvida na manutenção da integridade estrutural e proteção oxidativa do centro. Nesse sentido, a existência de um resíduo hidrofóbico na MtLPMO10, ou seja, não exposto à superfície, é razoável.

Essas variações, consistentes com as observadas nos homólogos Tma12, ScLPMO10D e CbpD, enzimas já caracterizadas experimentalmente como quitinolíticas, sugerem uma flexibilização do padrão até então determinante da afinidade por esse substrato. Neste sentido, têm-se demonstrado algumas variações nos padrões estruturais pré-estabelecidos para LPMOs bacterianas e, conforme discutido por Dade et al. (2022), dada a pequena proporção de prováveis enzimas da classe AA10 até então caracterizadas, padrões obtidos de um pequeno número de sequências deveriam ser considerados provisionais, uma vez que existem quase 11 mil sequências putativas de LPMOs AA10 no CAZy, sendo que apenas 38 constam como “caracterizadas”.

A simulação de dinâmica molecular durante 100 ns permitiu avaliar a interação da MtLPMO10 com oligômeros de quitina e celulose. O complexo MtLPMO10-quitina foi o mais

estável, corroborando uma provável especificidade pelo substrato quitina. O local de estabilização do ligante foi próximo do centro de cobre (Figura 14), e a região de contato estendeu-se deste a Glu50 até Leu208/Ser209, em um caminho na superfície proteica, sendo que dois aminoácidos aromáticos (His31 e Tyr70) e um aminoácido polar (Arg206) tiveram menor energia livre. Essas observações estão de acordo com o estudo de LPMOs, ao mostrar que a interação com o substrato é multi-ponto, estendendo-se para além dos aminoácidos ao redor do centro catalítico, inclusive com a participação de loops distantes do centro de cobre, e que sofre influência da topologia proteica de superfície (SIMMONS et al., 2017; COURTADE et al., 2018).

Tanto na MtLPM10 quanto na Tma12, na CbpD e na ScLPMO10D, a superfície de ligação do substrato é maior que a definida para a SmAA10A, estendendo-se para além da tirosina conservada (Figura 22), até um glutamato existente na extremidade dos subsítios negativos do ligante. Além disso a Tyr70 teve uma função relevante na DM, devido ao seu posicionamento na superfície proteica (Figura 22A). Porém, não se pode descartar uma função significativa de outros resíduos de superfície na interação com o substrato cristalino, o qual possui uma maior superfície de contato e, portanto, mais pontos de ancoragem que o oligossacarídeo utilizado aqui.

Na DM, a distância Cu-H4 foi menor que a distância Cu-H1, com média de  $6,0 \pm 0,7 \text{ \AA}$ . Essa distância sugere regioseletividade para C4 e é compatível com a existência de outros atores na interface de interação do cobre com o ligante. Diversos estudos têm mostrado que a reação de quebra de carboidratos mediada pelas LPMOs necessita de um co-substrato, com grupos de pesquisa defendendo que o  $O_2$  seria esse substrato, e outros grupos apontando que o  $H_2O_2$  seria o principal candidato, e essa molécula seria fonte de um oxigênio que, juntamente com o cobre, formaria uma espécie altamente reativa a qual, por meio de uma reação de hidroxilação, causaria a quebra da ligação glicosídica em C1 ou C4 (HAGEMANN; HEDEGÅRD, 2023).

Além disso, como sugerido por Bissaro et al. (2018), a existência de uma molécula única de água no centro catalítico (no estado ligado ao substrato) ajudaria a coordenar o átomo de cobre da LPMO quitinolítica SmAA10A (*Serratia marcescens*), formando uma geometria planar quadrada distorcida juntamente com os três nitrogênios da braçadeira de histidina. Logo, a distância teórica Cu-H4 nas condições da simulação permitiria a existência de intermediários entre o cobre e o ligante.

Na DM a porção C-terminal da MtLPMO10 foi truncada, incluindo o domínio CBM predito para esta região, devido à sua maior distância em relação ao centro catalítico de cobre e à

impossibilidade de simulação com um ligante maior (na forma cristalina) devido ao custo computacional envolvido. Também, essa região mostrou-se bem única em relação a outras LPMOs que possuíam alta identidade de sequências com a MtLPMO10 (Figura 9). Apesar disso, outros estudos têm apontado que a presença de um domínio de ligação a carboidratos em LPMOs pode aumentar a eficiência do processo de desconstrução da cadeia (COURTADE et al., 2018; LONG et al., 2019; CHALAK et al., 2019). Na DM, observou-se maior estabilidade do complexo proteína-ligante para a SmAA10A em comparação à MtLPMO10A, dados menores valores de RMSD em 100 ns. A SmAA10A é uma enzima de módulo único (não possui módulos acessórios como CBMs), o que pode ter-se refletido nas condições de simulação. Logo, a utilidade deste domínio CBM para a MtLPMO10 precisa ser melhor investigada.

Quanto ao estado oxidativo do metal, o estado não ligado ao substrato é o  $\text{Cu}^{2+}$  e o ligado ao substrato é o  $\text{Cu}^{1+}$ . No presente estudo a simulação de dinâmica molecular ocorreu com o cobre em estado de oxidação 1+ (reduzido), o qual tem sido reportado na literatura como o de maior afinidade tanto com os resíduos do centro catalítico (QUINLAN et al., 2011; AACHMANN et al., 2012) quanto com o substrato (KRACHER et al., 2018; HAGEMANN; HEDEGÅRD, 2023).

A co-ocorrência e proximidade gênica de LPMOs com enzimas hidrolases em um mesmo genoma têm sido apontadas como importantes para a degradação de carboidratos em bactérias (SRIVASTAVA; DAFALE; PUROHIT, 2020). Por exemplo, a co-ocorrência da hidrolase GH18 com LPMOs em clusters gênicos é encontrada em linhagens quitinolíticas de *Pseudoalteromonas* marinhas (PAULSEN et al., 2019; AL-AAMRI et al., 2019). Porém, a ocorrência de genes para hidrolases no genoma de *Mastigocoleus testarum* não foi avaliada no presente estudo.

Ademais, estudos da interação entre LPMOs e substratos usando métodos computacionais (estudos de *docking* e dinâmica molecular) têm sido úteis sobretudo devido à dificuldade no uso de ligantes complexos (como carboidratos na forma cristalina) em métodos experimentais, como na cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear (MNR) e espectroscopia paramagnética (EPR). Os polissacarídeos possuem solubilidade limitada em certos solventes que são necessários para obtenção de cristais na análise de cristalografia de raios X, bem como possuem grande heterogeneidade estrutural, mesmo dentro de uma mesma amostra, o que dificulta a obtenção de dados cristalográficos representativos, além da existência de muitos átomos leves que causam fraca intensidade de difração. A NMR possui menor nível de detalhamento da cristalografia e sofre com a distorção de sinal de núcleos próximos ao Cu em estado 2+. Já o EPR é mais útil em determinar

a posição do centro de cobre em relação ao substrato, sem muitos detalhes sobre que aminoácidos participam da interação. Assim, os métodos computacionais ainda são importantes ferramentas no entendimento da interação LPMO-ligante, por permitirem a visualização de uma enzima e seu substrato em uma escala atômica (BISSARO et al., 2018; ZHOU et al., 2020, p. 20; IPSEN et al., 2021).

## 6 CONCLUSÃO

A MtLPMO10 é uma provável LPMO multidomínio da classe AA10 com 289 resíduos. Há um peptídeo sinal de 30 resíduos na extremidade C-terminal, seguido de um domínio LPMO\_AA10, que seria o domínio catalítico, e um domínio CBM de ligação à quitina na região N-terminal.

A análise filogenética da MtLPMO10 indicou que ela é mais próxima da enzima Tma12 (de *Tectaria macrodonta*), a qual possui especificidade por quitina e regioseletividade pelo carbono C4 da ligação glicosídica. Outras enzimas com estrutura determinada experimentalmente e com mais de 40% de identidade de sequências são a CbpD (de *Pseudomonas aeruginosa*) e a ScLPMO10D (de *Streptomyces coelicolor*), ambas quitinolíticas.

O alinhamento múltiplo de sequências das quatro proteínas mencionadas acima com a sequência da SmAA10A (enzima pioneira da classe AA10) permitiu identificar atributos, alguns conservados e outros com variações na sequência de resíduos, muitas dessas variações compartilhadas entre a MtLPMO10, Tma12, CbpD e ScLPMO10D.

Em especial, a MtLPMO10 possui uma substituição importante Ala>Thr130 na esfera de coordenação secundária, com uma Ala129 próxima a esta substituição. O padrão “WWW” assume a forma “YMW”, o padrão “TAXH” ocorre como “ATXH”, o par de reconhecimento de quitina Gln-Thr ocorre como His73-Ala129, o padrão “Y(W)EPQSVE” ocorre como “YDWXXVN” e o par de controle ao acesso do túnel Glu-Asn ocorre como Asn-Glu.

A estrutura terciária predita pelo AlphaFold mostrou alta similaridade estrutural com a Tma12 (RMSD=0,728) e características estruturais marcantes de LPMOs, como um domínio similar à imunoglobulina com fitas beta antiparalelas, uma braçadeira de histidinas composta por His31 e His132 e uma Phe213 na esfera de coordenação secundária.

A DM indicou uma maior estabilidade do complexo MtLPMO10-quitina em comparação ao complexo MtLPMO10-celoheptaose, corroborando uma provável especificidade por quitina. Apesar disso, o complexo SmAA10A-quitina obteve melhores valores de RMSD para a proteína e o ligante. No complexo MtLPMO10-quitina, a menor distância Cu(I)-H4 comparada à distância Cu(I)-H1 sugere uma regioseletividade para o carbono C4 da ligação glicosídica.

A decomposição de energias mostrou que a superfície provável de interação com o carboidrato estende-se da Glu50 próximo ao subsítio -4 do ligante até a Leu208/Ser209 próximas ao subsítio +4. A superfície de interação tanto na MtLPMO10 quanto na Tma12, CbpD e

ScLPMO10D são maiores que a encontrada na SmAA10A. Três resíduos polares foram mais importantes na interação com o ligante: Arg206, His31 e Ser209. A histidina é a N-terminal da braçadeira e a arginina e serina são resíduos em interação com subsítios positivos.

A expressão da proteína e a caracterização da atividade enzimática *in vitro* são os próximos passos necessários para confirmar a especificidade e regioseletividade sugerida pelos estudos computacionais aqui apresentados.

## REFERÊNCIAS

- AACHMANN, F. L.; SØRLIE, M.; SKJÅK-BRÆK, G.; EIJSINK, V. G. H.; VAAJE-KOLSTAD, G. NMR structure of a lytic polysaccharide monoxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 46, p. 18779–18784, 2012.
- ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1–12, 2009.
- ABOIM, J. B.; OLIVEIRA, D. T. DE; MESCOUTO, V. A. DE; DOS REIS, A. S.; DA ROCHA FILHO, G. N.; SANTOS, A. V.; XAVIER, L. P.; SANTOS, A. S.; GONÇALVES, E. C.; DO NASCIMENTO, L. A. S. Optimization of Light Intensity and NaNO<sub>3</sub> Concentration in Amazon Cyanobacteria Cultivation to Produce Biodiesel. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 12, p. 2326, 2019.
- AGUILAR, A.; TWARDOWSKI, T.; WOHLGEMUTH, R. Bioeconomy for Sustainable Development. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 8, p. e1800638, 2019.
- AL-AAMRI, A.; TAHA, K.; AL-HAMMADI, Y.; MAALOUF, M.; HOMOUZ, D. Analyzing a co-occurrence gene-interaction network to identify disease-gene association. **BMC Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 70, 2019.
- ALLIED MARKET RESEARCH. **Enzymes Market Statistics, Growth Drivers | Forecast - 2031**. Disponível em: <<https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>>. Acesso em: 9 set. 2023.
- ARAI, M.; HAYASHI, Y.; KUDO, H. Cyanobacterial Enzymes for Bioalkane Production. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1080, p. 119–154, 2018.
- ARORA, R.; BHARVAL, P.; SARSWATI, S.; SEN, T. Z.; YENNAMALLI, R. M. Structural dynamics of lytic polysaccharide monoxygenases reveals a highly flexible substrate binding region. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 88, p. 1–10, 2019.
- ASKARIAN, F.; TSAI, C.-M.; CORDARA, G.; ZURICH, R. H.; BJÅNES, E.; GOLTEN, O.; VINTHER SØRENSEN, H.; KOUSHA, A.; MEIER, A.; CHIKWATI, E.; BRUUN, J.-A.; LUDVIKSEN, J. A.; CHOUDHURY, B.; TRIEU, D.; DAVIS, S.; EDVARDBSEN, P. K. T.; MOLLNES, T. E.; LIU, G. Y.; KRENGEL, U.; CONRAD, D. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; NIZET, V. Immunization with lytic polysaccharide monoxygenase CbpD induces protective immunity against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 30, p. e2301538120, 2023.
- ASKARIAN, F.; UCHIYAMA, S.; MASSON, H.; SØRENSEN, H. V.; GOLTEN, O.; BUNÆS, A. C.; MEKASHA, S.; RØHR, Å. K.; KOMMEDAL, E.; LUDVIKSEN, J. A.; ARNTZEN, M. Ø.; SCHMIDT, B.; ZURICH, R. H.; VAN SORGE, N. M.; EIJSINK, V. G. H.; KRENGEL, U.; MOLLNES, T. E.; LEWIS, N. E.; NIZET, V.; VAAJE-KOLSTAD, G. The lytic polysaccharide monoxygenase CbpD promotes *Pseudomonas aeruginosa* virulence in systemic infection. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1230, 2021.

- 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, n. 1, p. 923–946, 2015.
- BISSARO, B.; ISAKSEN, I.; VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJSINK, V. G. H.; RØHR, Å. K. How a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Binds Crystalline Chitin. **Biochemistry**, v. 57, n. 12, p. 1893–1906, 2018.
- BISSARO, B.; STREIT, B.; ISAKSEN, I.; EIJSINK, V. G. H.; BECKHAM, G. T.; DUBOIS, J. L.; RØHR, Å. K. Molecular mechanism of the chitinolytic peroxygenase reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 3, p. 1504–1513, 2020.
- CHALAK, A.; VILLARES, A.; MOREAU, C.; HAON, M.; GRISEL, S.; D'ORLANDO, A.; HERPOËL-GIMBERT, I.; LABOUREL, A.; CATHALA, B.; BERRIN, J.-G. Influence of the carbohydrate-binding module on the activity of a fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenase on cellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 206, 2019.
- CHIU, E.; HIJNEN, M.; BUNKER, R. D.; BOUDES, M.; RAJENDRAN, C.; AIZEL, K.; OLIÉRIC, V.; SCHULZE-BRIESE, C.; MITSUHASHI, W.; YOUNG, V.; WARD, V. K.; BERGOIN, M.; METCALF, P.; COULIBALY, F. Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 13, p. 3973–3978, 2015.
- CHYLENSKI, P.; BISSARO, B.; SØRLIE, M.; RØHR, Å. K.; VÁRNAI, A.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Enzymatic Processing of Lignocellulosic Biomass. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 6, p. 4970–4991, 2019.
- CORFIELD, A. P. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 1, p. 236–252, 2015.
- COURTADE, G.; FORSBERG, Z.; HEGGSET, E. B.; EIJSINK, V. G. H.; AACHMANN, F. L. The carbohydrate-binding module and linker of a modular lytic polysaccharide monooxygenase promote localized cellulose oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 34, p. 13006–13015, 2018.
- DADE, C. M.; DOUZI, B.; CABBILLAU, C.; BALL, G.; VOULHOUX, R.; FOREST, K. T. The crystal structure of CbpD clarifies substrate-specificity motifs in chitin-active lytic polysaccharide monooxygenases. **Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology**, v. 78, n. Pt 8, p. 1064–1078, 2022.
- DUCAT, D. C.; WAY, J. C.; SILVER, P. A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 95–103, 2011.
- EIJSINK, V. G. H.; PETROVIC, D.; FORSBERG, Z.; MEKASHA, S.; RØHR, Å. K.; VÁRNAI, A.; BISSARO, B.; VAAJE-KOLSTAD, G. On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, 2019.

ELLEUCH, J.; HADJ KACEM, F.; BEN AMOR, F.; HADRICH, B.; MICHAUD, P.; FENDRI, I.; ABDELKAFI, S. Extracellular neutral protease from *Arthrospira platensis*: Production, optimization and partial characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1491–1498, 2021.

ERDRICH, P.; KNOOP, H.; STEUER, R.; KLAMT, S. Cyanobacterial biofuels: new insights and strain design strategies revealed by computational modeling. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 128, 2014.

ERIKSSON, K.-E.; PETTERSSON, B.; WESTERMARK, U. Oxidation: An important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. **FEBS Letters**, v. 49, n. 2, p. 282–285, 1974.

FILIATRAULT-CHASTEL, C.; HEISS-BLANQUET, S.; MARGEOT, A.; BERRIN, J.-G. From fungal secretomes to enzymes cocktails: The path forward to bioeconomy. **Biotechnology Advances**, v. 52, p. 107833, 2021.

FORSBERG, Z.; NELSON, C. E.; DALHUS, B.; MEKASHA, S.; LOOSE, J. S. M.; CROUCH, L. I.; RØHR, Å. K.; GARDNER, J. G.; EIJSINK, V. G. H.; VAAJE-KOLSTAD, G. Structural and Functional Analysis of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase Important for Efficient Utilization of Chitin in *Cellvibrio japonicus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 14, p. 7300–7312, 2016.

FORSBERG, Z.; RØHR, Å. K.; MEKASHA, S.; ANDERSSON, K. K.; EIJSINK, V. G. H.; VAAJE-KOLSTAD, G.; SØRLIE, M. Comparative Study of Two Chitin-Active and Two Cellulose-Active AA10-Type Lytic Polysaccharide Monooxygenases. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1647–1656, 2014.

FORSBERG, Z.; SØRLIE, M.; PETROVIĆ, D.; COURTADE, G.; AACHMANN, F. L.; VAAJE-KOLSTAD, G.; BISSARO, B.; RØHR, Å. K.; EIJSINK, V. G. Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monooxygenases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 59, p. 54–64, 2019.

FRANDSEN, K. E. H.; LO LEGGIO, L. Lytic polysaccharide monooxygenases: a crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes. **IUCrJ**, v. 3, n. 6, p. 448–467, 2016.

FRANDSEN, K. E. H.; SIMMONS, T. J.; DUPREE, P.; POULSEN, J.-C. N.; HEMSWORTH, G. R.; CIANO, L.; JOHNSTON, E. M.; TOVBORG, M.; JOHANSEN, K. S.; VON FREIESLEBEN, P.; MARMUSE, L.; FORT, S.; COTTAZ, S.; DRIGUEZ, H.; HENRISSAT, B.; LENFANT, N.; TUNA, F.; BALDANSUREN, A.; DAVIES, G. J.; LEGGIO, L. L.; WALTON, P. H. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. **Nat Chem Biol**, v. 12, n. 4, p. 298–303, 2016.

GASPAR, A. R.; MEDINA, V. G. G.; LI, X.; MULDER, K. C. L.; SHOWS, A. **METHODS FOR LACTIC ACID REDUCTION IN A BIOCARBURIZER FERMENTATION SYSTEM**. , 2 maio 2019. Disponível em:

<<https://patents.google.com/patent/WO2019083831A1/en?q=WO2019083831>>. Acesso em: 8 set. 2023

GUIDA, B. S.; GARCIA-PICHEL, F. Extreme cellular adaptations and cell differentiation required by a cyanobacterium for carbonate excavation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 20, p. 5712–5717, 2016.

GUO, X.; AN, Y.; JIANG, L.; ZHANG, J.; LU, F.; LIU, F. The discovery and enzymatic characterization of a novel AA10 LPMO from *Bacillus amyloliquefaciens* with dual substrate specificity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 203, p. 457–465, 2022.

HAGEMANN, M. M.; HEDEGÅRD, E. D. Molecular Mechanism of Substrate Oxidation in Lytic Polysaccharide Monooxygenases: Insight from Theoretical Investigations. **Chemistry – A European Journal**, v. 29, n. 7, 2023.

HARRIS, P. V.; WELNER, D.; MCFARLAND, K. C.; RE, E.; NAVARRO POULSEN, J.-C.; BROWN, K.; SALBO, R.; DING, H.; VLASENKO, E.; MERINO, S.; XU, F.; CHERRY, J.; LARSEN, S.; LO LEGGIO, L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305–3316, 2010.

IPSEN, J.; HALLAS-MØLLER, M.; BRANDER, S.; LEGGIO, L. L.; JOHANSEN, K. S. Lytic polysaccharide monooxygenases and other histidine-brace copper proteins: Structure, oxygen activation and biotechnological applications. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 1, p. 531–540, 2021.

JENSEN, M. S.; KLINKENBERG, G.; BISSARO, B.; CHYLENSKI, P.; VAAJE-KOLSTAD, G.; KVITVANG, H. F.; NÆRDAL, G. K.; SLETTA, H.; FORSBERG, Z.; EIJSINK, V. G. H. Engineering chitinolytic activity into a cellulose-active lytic polysaccharide monooxygenase provides insights into substrate specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 50, p. 19349–19364, 2019.

JEOH, T.; ISHIZAWA, C. I.; DAVIS, M. F.; HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S.; JOHNSON, D. K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 112–122, 2007.

JOHANSEN, K. S. Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide monooxygenases. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, p. 143–149, 2016.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, S. A. A.; BALLARD, A. J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, A. W.; KAVUKCUOGLU, K.; KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

KLÄHN, S.; BAUMGARTNER, D.; PFREUNDT, U.; VOIGT, K.; SCHÖN, V.; STEGLICH, C.; HESS, W. R. Alkane Biosynthesis Genes in Cyanobacteria and Their Transcriptional Organization. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 2, p. 24, 2014.

KOBAYASHI, S.; ATSUMI, S.; IKEBUKURO, K.; SODE, K.; ASANO, R. Light-induced production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol by metabolically engineered cyanobacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 21, p. 7, 2022.

KOETSIER, M. J.; VISSER, J.; HINZ, S. W. A.; KABEL, M. A.; FROMMHAGEN, M.; GRUPPEN, H. **Enzymatic activity of lytic polysaccharide monooxygenase**. , 15 set. 2016. Disponível em:

<<https://patents.google.com/patent/WO2016142536A1/en?q=+WO2016142536>>. Acesso em: 8 set. 2023

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, n. 4, 2014.

KRACHER, D.; ANDLAR, M.; FURTMÜLLER, P. G.; LUDWIG, R. Active-site copper reduction promotes substrate binding of fungal lytic polysaccharide monooxygenase and reduces stability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 5, p. 1676–1687, 2018.

KULASOORIYA, S. A. Cyanobacteria: Pioneers of Planet Earth. **Ceylon Journal of Science**, v. 40, n. 2, p. 71, 2012.

LI, F.; LIU, Y.; LIU, Y.; LI, Y.; YU, H. Heterologous expression and characterization of a novel lytic polysaccharide monooxygenase from Natribalbeaceae archaeon and its application for chitin biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 354, p. 127174, 2022.

LI, P.; MERZ, K. M. MCPB.py: A Python Based Metal Center Parameter Builder. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 4, p. 599–604, 2016.

LIN, J.; BOHAN, D.; MARANTA, M.; BERESFORD, L.; LAMSA, M.; SWEENEY, M.; WOGULIS, M.; ZNAMEROSKI, E.; RASMUSSEN, F. W. **GH61 Polypeptide Variants and Polynucleotides Encoding Same**. , 23 maio 2019. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20190153414A1/en?q=US2019153414>>. Acesso em: 8 set. 2023

LIU, B.; KOGNOLE, A. A.; WU, M.; WESTERENG, B.; CROWLEY, M. F.; KIM, S.; DIMAROGONA, M.; PAYNE, C. M.; SANDGREN, M. Structural and molecular dynamics studies of a C1-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase from *Heterobasidium irregulare* reveal amino acids important for substrate recognition. **FEBS Journal**, v. 285, n. 12, p. 2225–2242, 2018.

LONG, L.; HU, J.; LI, X.; ZHANG, Y.; WANG, F. The Potential of Using Thermostable Xylan-Binding Domain as a Molecular Probe to Better Understand the Xylan Distribution of Cellulosic Fibers. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, p. acssuschemeng.9b02261, 2019.

LONG, L.; HU, Y.; SUN, F.; GAO, W.; HAO, Z.; YIN, H. Advances in lytic polysaccharide monooxygenases with the cellulose-degrading auxiliary activity family 9 to facilitate cellulose degradation for biorefinery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 219, p. 68–83, 2022.

- MAIER, J. A.; MARTINEZ, C.; KASAVAJHALA, K.; WICKSTROM, L.; HAUSER, K. E.; SIMMERLING, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 8, p. 3696–3713, 2015.
- MARTINS, J.; LEÃO, P. N.; RAMOS, V.; VASCONCELOS, V. N-terminal protease gene phylogeny reveals the potential for novel cyanobactin diversity in cyanobacteria. **Marine Drugs**, v. 11, n. 12, p. 4902–4916, 2013.
- NIELSEN, J.; KEASLING, J. D. Engineering Cellular Metabolism. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1185–1197, 2016.
- PARVEEN, H.; YAZDANI, S. S. Insights into cyanobacterial alkane biosynthesis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 49, n. 2, p. kuab075, 2022.
- PATIPONG, T.; KAGEYAMA, H.; WADITEE-SIRISATTHA, R. Insights into the phylogeny and transcriptional response of serine proteases in a halotolerant cyanobacterium *Halotheca* sp. PCC7418. **Plant Signaling & Behavior**, v. 16, n. 9, p. 1913556, 2021.
- PAULSEN, S. S.; STRUBE, M. L.; BECH, P. K.; GRAM, L.; SONNENSCHNEIN, E. C. Marine Chitinolytic *Pseudoalteromonas* Represents an Untapped Reservoir of Bioactive Potential. **mSystems**, v. 4, n. 4, p. e00060-19, 2019.
- PELLIS, A.; CANTONE, S.; EBERT, C.; GARDOSSI, L. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. **New Biotechnology**, v. 40, n. Pt A, p. 154–169, 2018.
- PHILLIPS, C. M.; BEESON, W. T.; CATE, J. H.; MARLETTA, M. A. Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 12, p. 1399–1406, 2011.
- PRASANNA, R.; NAIN, L.; TRIPATHI, R.; GUPTA, V.; CHAUDHARY, V.; MIDDHA, S.; JOSHI, M.; ANCHA, R.; KAUSHIK, B. D. Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria – possible role of hydrolytic enzymes. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 186–194, 2008.
- QUINLAN, R. J.; SWEENEY, M. D.; LO LEGGIO, L.; OTTEN, H.; POULSEN, J.-C. N.; JOHANSEN, K. S.; KROGH, K. B. R. M.; JØRGENSEN, C. I.; TOVBORG, M.; ANTHONSEN, A.; TRYFONA, T.; WALTER, C. P.; DUPREE, P.; XU, F.; DAVIES, G. J.; WALTON, P. H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 37, p. 15079–15084, 2011.
- RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 521–539, 2009.
- REESE, E. T.; GILLIGAN, W. The Swelling Factor in Cellulose Hydrolysis. **Textile Research Journal**, v. 24, n. 7, p. 663–669, 1954.

REETZ, M. T. **Directed Evolution of Selective Enzymes: Catalysts for Organic Chemistry and Biotechnology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2016.

REYES-SOSA, F. M.; MOLINA-HEREDIA, F. P.; DE LA ROSA, M. A. A novel alpha-amylase from the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7119. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 131–141, 2010.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Web Server issue, p. W320-324, 2014.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015.

SABBADIN, F.; HEMSWORTH, G. R.; CIANO, L.; HENRISSAT, B.; DUPREE, P.; TRYFONA, T.; MARQUES, R. D. S.; SWEENEY, S. T.; BESSER, K.; ELIAS, L.; PESANTE, G.; LI, Y.; DOWLE, A. A.; BATES, R.; GOMEZ, L. D.; SIMISTER, R.; DAVIES, G. J.; WALTON, P. H.; BRUCE, N. C.; MCQUEEN-MASON, S. J. An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 756, 2018.

SADVAKASOVA, A. K.; KOSSALBAYEV, B. D.; ZAYADAN, B. K.; KIRBAYEVA, D. K.; ALWASEL, S.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Potential of cyanobacteria in the conversion of wastewater to biofuels. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 140, 2021.

SAINI, J. K. Recent developments in cellulolytic enzymes for ethanol production. Em: **Advanced Biofuel Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 195–215.

SCHNELLMANN, J.; ZELTINS, A.; BLAAK, H.; SCHREMPF, H. The novel lectin-like protein CHB1 is encoded by a chitin-inducible *Streptomyces olivaceoviridis* gene and binds specifically to crystalline beta-chitin of fungi and other organisms. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 807–819, 1994.

SHUKLA, A. K.; UPADHYAY, S. K.; MISHRA, M.; SAURABH, S.; SINGH, R.; SINGH, H.; THAKUR, N.; RAI, P.; PANDEY, P.; HANS, A. L.; SRIVASTAVA, S.; RAJAPURE, V.; YADAV, S. K.; SINGH, M. K.; KUMAR, J.; CHANDRASHEKAR, K.; VERMA, P. C.; SINGH, A. P.; NAIR, K. N.; BHADAURIA, S.; WAHAJUDDIN, M.; SINGH, S.; SHARMA, S.; OMKAR, NULL; UPADHYAY, R. S.; RANADE, S. A.; TULI, R.; SINGH, P. K. Expression of an insecticidal fern protein in cotton protects against whitefly. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 1046–1051, 2016.

SIMMONS, T. J.; FRANDBEN, K. E. H.; CIANO, L.; TRYFONA, T.; LENFANT, N.; POULSEN, J. C.; WILSON, L. F. L.; TANDRUP, T.; TOVBORG, M.; SCHNORR, K.; JOHANSEN, K. S.; HENRISSAT, B.; WALTON, P. H.; LO LEGGIO, L.; DUPREE, P. Structural and electronic determinants of lytic polysaccharide monooxygenase reactivity on polysaccharide substrates. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1064, 2017.

SMANSKI, M. J.; ZHOU, H.; CLAESEN, J.; SHEN, B.; FISCHBACH, M. A.; VOIGT, C. A. Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 135–149, 2016.

SMOLKE, C. **Synthetic Biology: Parts, Devices and Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2018.

SOONG, C.-L.; SAUNDERS, J. **Processes of producing a fermentation product**. , 6 out. 2011. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/WO2011123505A1/en?q=WO2011123505>>. Acesso em: 8 set. 2023

SRIVASTAVA, S.; DAFALE, N. A.; PUROHIT, H. J. Functional genomics assessment of lytic polysaccharide mono-oxygenase with glycoside hydrolases in *Paenibacillus dendritiformis* CRN18. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3729–3738, 2020.

SUNNA, A.; MORACCI, M.; ROSSI, M.; ANTRANIKIAN, G. Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. **Extremophiles**, v. 1, n. 1, p. 2–13, 1997.

SUZUKI, K.; SUZUKI, M.; TAIYOJI, M.; NIKAIDOU, N.; WATANABE, T. Chitin Binding Protein (CBP21) in the Culture Supernatant of *Serratia marcescens* 2170. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 128–135, 1998.

TANDRUP, T.; FRANDBSEN, K. E. H.; JOHANSEN, K. S.; BERRIN, J. G.; LEGGIO, L. L. Recent insights into lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 6, p. 1431–1447, 2018.

TESSIER, M. B.; DEMARCO, M. L.; YONGYE, A. B.; WOODS, R. J. Extension of the GLYCAM06 Biomolecular Force Field to Lipids, Lipid Bilayers and Glycolipids. **Molecular Simulation**, v. 34, n. 4, p. 349–363, 2008.

VAAJE-KOLSTAD, G.; FORSBERG, Z.; LOOSE, J. S.; BISSARO, B.; EIJSINK, V. G. Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 44, p. 67–76, 2017.

VAAJE-KOLSTAD, G.; HOUSTON, D. R.; RIEMEN, A. H. K.; EIJSINK, V. G. H.; VAN AALTEN, D. M. F. Crystal Structure and Binding Properties of the *Serratia marcescens* Chitin-binding Protein CBP21. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11313–11319, 2005.

VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; HORN, S. J.; LIU, Z.; ZHAI, H.; SØRLIE, M.; EIJSINK, V. G. H. An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 219–222, 2010.

VAN DISSEL, D.; CLAESSEN, D.; VAN WEZEL, G. P. Morphogenesis of *Streptomyces* in Submerged Cultures. Em: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 89p. 1–45.

VANDHANA, T. M.; REYRE, J.; SUSHMAA, D.; BERRIN, J.; BISSARO, B.; MADHUPRAKASH, J. On the expansion of biological functions of lytic polysaccharide monoxygenases. **New Phytologist**, v. 233, n. 6, p. 2380–2396, 2022.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015.

VOTVIK, A. K.; RØHR, Å. K.; BISSARO, B.; STEPNOV, A. A.; SØRLIE, M.; EIJSINK, V. G. H.; FORSBERG, Z. Structural and functional characterization of the catalytic domain of a cell-wall anchored bacterial lytic polysaccharide monoxygenase from *Streptomyces coelicolor*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 5345, 2023.

VU, V. V.; NGO, S. T. Copper active site in polysaccharide monoxygenases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 368, p. 134–157, 2018.

WALTER, S.; SCHREMPF, H. Characteristics of the surface-located carbohydrate-binding protein CbpC from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 119–127, 2008.

WANG, D.; LI, Y.; ZHENG, Y.; HSIEH, Y. S. Y. Recent Advances in Screening Methods for the Functional Investigation of Lytic Polysaccharide Monoxygenases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 2021.

WANG, J.; WOLF, R. M.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 2004.

WESTERENG, B.; AGGER, J. W.; HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; AACHMANN, F. L.; STENSTRØM, Y. H.; EIJSINK, V. G. H. Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monoxygenases. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, n. 1, p. 144–152, 2013.

WOOLSTON, B. M.; EDGAR, S.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolic engineering: past and future. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 4, p. 259–288, 2013.

WU, M.; BECKHAM, G. T.; LARSSON, A. M.; ISHIDA, T.; KIM, S.; PAYNE, C. M.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M. F.; HORN, S. J.; WESTERENG, B.; IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; STÅHLBERG, J.; EIJSINK, V. G. H.; SANDGREN, M. Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monoxygenase GH61D from the basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12828–12839, 2013.

YADAV, G.; SEKAR, M.; KIM, S.-H.; GEO, V. E.; BHATIA, S. K.; SABIR, J. S. M.; CHI, N. T. L.; BRINDHADEVI, K.; PUGAZHENDHI, A. Lipid content, biomass density, fatty acid as selection markers for evaluating the suitability of four fast growing cyanobacterial strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 325, p. 124654, 2021.

YADAV, S. K.; ARCHANA, NULL; SINGH, R.; SINGH, P. K.; VASUDEV, P. G. Insecticidal fern protein Tma12 is possibly a lytic polysaccharide monooxygenase. **Planta**, v. 249, n. 6, p. 1987–1996, 2019.

YAN, S.; LI, J.; CHEN, X.; WU, J.; WANG, P.; YE, J.; YAO, J. Enzymatical hydrolysis of food waste and ethanol production from the hydrolysate. **Renewable Energy**, v. 36, n. 4, p. 1259–1265, 2011.

YE, M.; LIU, J.; MA, C.; LI, Y.-Y.; ZOU, L.; QIAN, G.; XU, Z. P. Improving the stability and efficiency of anaerobic digestion of food waste using additives: A critical review. **Journal of Cleaner Production**, v. 192, p. 316–326, 2018.

ZHONG, X.; ZHANG, L.; VAN WEZEL, G. P.; VIJGENBOOM, E.; CLAESSEN, D. Role for a Lytic Polysaccharide Monooxygenase in Cell Wall Remodeling in *Streptomyces coelicolor*. **mBio**, v. 13, n. 2, p. e00456-22, 2022.

ZHOU, H.; ZHANG, Y.; LI, T.; TAN, H.; LI, G.; YIN, H. Distinct Interaction of Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Cellulose Revealed by Computational and Biochemical Studies. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 11, n. 10, p. 3987–3992, 2020.

ZHOU, X.; QI, X.; HUANG, H.; ZHU, H. Sequence and Structural Analysis of AA9 and AA10 LPMOs: An Insight into the Basis of Substrate Specificity and Regioselectivity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4594, 2019.

ZHOU, X.; ZHU, H. Current understanding of substrate specificity and regioselectivity of LPMOs. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 7, n. 1, p. 11, 2020.

ZHUANG, H.; LEE, P.-H.; WU, Z.; JING, H.; GUAN, J.; TANG, X.; TAN, G.-Y. A.; LEU, S.-Y. Genomic driven factors enhance biocatalyst-related cellulolysis potential in anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 333, p. 125148, 2021.