

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DE LPMOS DE *TRICHODERMA HARZIANUM*

Maria Eduarda Chaves Ribeiro^{1*}; Natan de Oliveira Bezerra Pereira¹; Eliane
Ferreira Noronha¹

¹Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Enzimologia, Brasília - DF. *E-mail do autor apresentador: mariaeduarda12388@gmail.com

LPMOs (Mono- Oxigenases Líticas de Polissacarídeos) são enzimas dependentes de cobre que catalisam a quebra de ligações glicosídicas e potencializam a degradação de polissacarídeos recalcitrantes em sinergia com glicosídeo hidrolases. A biomassa lignocelulósica produzida como rejeito na indústria sucroalcooleira, dentre outras atividades econômicas no Brasil, é uma matéria-prima de baixo custo e alto valor que é subaproveitada por essas indústrias. A reutilização deste material para geração de bioprodutos requer um processo eficiente de sua desconstrução, as LPMOs foram descritas como enzimas-chave neste processo. Desta forma, tem-se investido na caracterização de LPMOs, principalmente as fúngicas. A partir da seleção de fungos filamentosos conversores de lignocelulose, um isolado de *Trichoderma harzianum* de nossa coleção de fungos de solos do Cerrado da Região Centro-Oeste apresentou os maiores valores de atividades enzimáticas relacionadas à desconstrução dessa matéria-prima. No presente trabalho, o objetivo central é obter por expressão heteróloga na levedura *Komagataella phaffi* e caracterizar as LPMOs desse fungo, visando sua utilização em coquetéis enzimáticos para aplicação em processos biotecnológicos baseados em lignocelulose como matéria-prima. O gene selecionado, Triha1 131108, codifica uma proteína classificada no CAZy na família AA9 (Pfam03443), com peptídeo sinal (19 primeiros resíduos de aminoácidos), massa molecular de 40,907 kDa e ponto isoelétrico teórico de 4.60. Os resíduos de aminoácidos His1 e His131 constituem o 'Histidine Brace' dessa LPMO, responsável pela coordenação do átomo de cobre ao sítio ativo da enzima. Além disto, foram identificadas regiões altamente conservadas por meio do alinhamento das sequências proteicas de LPMOs AA9 de outros fungos, sobretudo nas regiões próximas ao C-terminal dessas proteínas. O gene de interesse de 1129 bp foi obtido por RT-PCR e clonado no vetor pGEM-T Easy, utilizando a linhagem XL10-Gold de *Escherichia coli* como hospedeira. O plasmídeo contendo o gene de interesse, denominado pGEMT131, foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI/XhoI e o produto da restrição subclonado no vetor de expressão pPIC9. Foram obtidos quatro clones recombinantes. As próximas etapas visam a obtenção da proteína e sua caracterização.

Palavras-chave: LPMOs; *Trichoderma harzianum*; clonagem.

Agradecimentos: Ao CNPq, UnB e PRONEM – Embrapa Agroenergia.