



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA
E BIOLÓGICA- PPGTQB**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS
PROTEÍNAS AUXILIARES PARA APLICAÇÃO NA CONVERSÃO DE
BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

TESE DE DOUTORADO

JÉSSICA DE SÁ GUIMARÃES PEIXOTO

**Orientador: Prof. Dr. Fabrício Machado Silva
Coorientador: Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro**

**BRASÍLIA- DF
2019**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA
E BIOLÓGICA- PPGTQB**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS E IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS
PROTEÍNAS AUXILIARES PARA APLICAÇÃO NA CONVERSÃO
DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Tecnologias Química e Biológica.

JÉSSICA DE SÁ GUIMARÃES PEIXOTO

**Orientador: Prof. Dr. Fabrício Machado Silva
Coorientadora: Dra. Léia Cecília de Lima Fávoro**

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **Jéssica de Sá Guimarães Peixoto**, matrícula nº **15/0112904**, intitulada ***“Bioprospecção de fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas e caracterização de novas proteínas auxiliares para aplicação na conversão de biomassa lignocelulósica”***, apresentada no (a) Auditório 2 do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) em 13 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Talita Souza Carmo
Membro Titular (IB/UnB)

Prof.^a Dra. Eliane Ferreira Noronha
Membro Titular (IB/UnB)

Dra. Mônica Caraméz Triches Damaso
Membro Titular (Embrapa)

Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues Gambetta
Membro Suplente (EMBRAPA Agroenergia)

Em 13 de dezembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Para minha amada mãe Neuza de Sá, com carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar ao meu lado, sempre me protegendo, guiando e, principalmente, por me fazer acreditar que tudo é possível para quem acredita e corre atrás.

À minha família que me deu suporte e apoio nessa jornada. Aos meus pais Neuza e Agnaldo, que estiveram sempre ao meu lado, pela força, apoio, educação e incentivo na luta para que meus objetivos fossem atingidos.

Ao meu irmão Joviano, por estar sempre presente na minha vida.

Ao meu esposo Alexandre por me apoiar e me incentivar sempre em todas as decisões tomadas, para concretização dos meus sonhos, você foi fundamental!

À minha amiga especial Taís Aragão que foi meu porto seguro durante toda essa etapa, obrigada pelo carinho, cuidado e contribuição. Aos meus amigos, Bruno, Flávia, Gleiciane, Fernandinha, Artur, Elias, Viviane, Ana Paula, Karolline, Samira, Hélder, Amanda, Gisele, Luana, Mariana e Mirian, obrigada pelas conversas, risadas, paciência, ensinamentos, enfim, por me apoiarem e ajudarem em tudo que precisei sem medirem esforços.

Aos meus conterrâneos, não poderia esquecer Jonas, Gabriela, Thuanne e Claudiane, cada um contribuiu para que essa etapa fosse concretizada.

Às analistas da Embrapa Agroenergia, queridas Mestres Thaís Demarchi Mendes e Thályta Fraga Pacheco, por me ensinarem tanto, pelo apoio nos experimentos, nas infinitas planilhas, na estatística, pelas correções de textos, e claro pelo apoio psicológico (Coaching). Vocês fizeram meus dias mais leves e agradáveis. Obrigada meninas!

À Dra. Kelly Barreto Rodrigues, por todo apoio e ensinamentos de biologia molecular nas etapas de expressão heteróloga.

À Dra. Paula Marcela Duque Jaramillo, pelo comprometimento e ensinamentos em toda parte de caracterização enzimática de fungos, dicas, planejamento, enfim aprendi muito com você!

À Dra. Valquíria Martins Pereira, por todo auxílio na caracterização molecular de fungos desenvolvida neste trabalho.

À Dra. Gláucia Emy Okida Midorikawa, pelo auxílio nas análises de sequências.

À Dra. Amanda Souza e à Mestre Gisele Soares Anastácio, por todo apoio na produção de proteínas heterólogas em biorreator, e etapas de concentração e diálise.

Ao Dr. Helder Andrey Rocha Gomes, pelo apoio nos teste de caracterização das expansinas.

Ao analista da Embrapa Agroenergia Mestre Felipe Brandão de Paiva Carvalho, pelos ensinamentos na etapa de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

À analista da Embrapa Agroenergia Dra. Larissa Andreani, pelo apoio nos testes mecânicos das expansinas.

Ao pesquisador Dr. Leonardo Fonseca Valadares, do Laboratório de Processos Químicos (LPQ) da Embrapa Agroenergia, pelo acesso ao laboratório e aos equipamentos para análise das expansinas.

Ao meu orientador Professor Dr. Fabrício Machado Silva, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e momentos de descontração e pelos bons princípios de caráter e amor por sua profissão que levarei sempre comigo.

À minha coorientadora, Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro, por todo comprometimento, respeito, incentivo e por colaborar ativamente no meu crescimento profissional e pessoal. Tenho uma grande admiração por você e pelo seu grande coração que ajuda a todos sem distinção.

Às professoras Nádia Skorupa Parachin e Eliane Ferreira Noronha, pelas sugestões durante o exame de qualificação do doutorado.

À CAPES, pela concessão de bolsa no âmbito do Edital nº 15/2014 Capes-Embrapa, para o projeto intitulado "*Estudo de uso integral de biomassa lignocelulósica: pré-tratamentos,*

processos enzimáticos e termoquímico".

À Embrapa Agroenergia, pelo apoio financeiro do projeto "*UpZyme - Novas expansinas e monoxigenases de polissacarídeos líticas e sua validação como aditivo no processo de sacarificação de biomassa. Número 12.12.11.003.00.00*", ao qual esta tese de doutorado está vinculada.

À FAP-DF, pelo auxílio financeiro para participação e apresentação de trabalho em congresso internacional.

À Universidade de Brasília, por todo apoio acadêmico oferecido.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A produção de energia e de químicos renováveis a partir da bioconversão de biomassa lignocelulósica é uma alternativa para minimizar a utilização de combustíveis fósseis e para agregar valor a diferentes cadeias produtivas. O crescente uso de enzimas em biorrefinarias de lignocelulose é dependente de um constante processo de inovação no qual se visa um melhor desempenho e redução de custo de obtenção das enzimas. Uma das barreiras encontradas pelas enzimas hidrolíticas é a recalcitrância da parede celular vegetal, mais especificamente da estrutura da celulose. Muitas das atividades enzimáticas requeridas pelo processo industrial dependem do somatório de diferentes enzimas que atuam em sinergismo. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar uma coleção de 291 fungos endofíticos de *Paullinia cupana* (guaranazeiro) e *Rhizophora mangle* (mangue-vermelho) quanto à capacidade de produzir extratos enzimáticos eficazes para desconstrução de biomassa pré-tratada de cana-de-açúcar, principal matéria-prima para o desenvolvimento da bioeconomia no Brasil. Além disso, no presente estudo duas β -expansinas de cana-de-açúcar, previamente identificadas por apresentarem especificidade na atuação no colmo de plantas adultas (SacEXP49 e SacEXP82), foram expressas com sucesso na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* X-33 e alguns aspectos básicos de sua função foram investigados por ensaio de ligação à celulose microcristalina, determinação da resistência à tração de papel filtro tratado com as expansinas recombinantes e testes de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por método organosolv, utilizando celulasas comerciais. Os resultados mostraram que as expansinas SacEXP49 e SacEXP82 recombinantes não possuem atividade hidrolítica sobre papel filtro e são capazes de se ligar à celulose microcristalina. Estas expansinas recombinantes não apresentaram sinergismo com celulasas na hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado, nas condições reacionais utilizadas. No entanto, elas alteraram significativamente a força tênsil de fibras de papel filtro em comparação com BSA (albumina de soro bovino, controle negativo) e de forma equivalente à uréia (controle positivo). Esses resultados revelam o potencial dessas proteínas como bioproduto renovável para aplicações na indústria baseada em celulose que dependem de modificações das propriedades físicas das fibras, para obter produtos derivados com características distintas. Quanto à seleção de fungos produtores de enzimas para desconstrução de lignocelulose presente no bagaço de cana pré-tratado, a estratégia de prospecção utilizada levou à seleção da cepa *Talaromyces amestolkiae* CP-230. Os extratos enzimáticos brutos (secretomas) deste fungo, obtidos a partir do cultivo não otimizado em fermentação submersa com bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise ou por organosolv e aplicados como catalisadores na sacarificação destas biomassas foram tão eficientes na liberação de glicose (rendimento de glicose) quanto a enzima comercial Cellic CTec 3, nas condições utilizadas (5,0% de teor de sólidos; 3,3 FPU/g de biomassa; 50°C; 200 rpm; 24 horas). Esses resultados mostram que a bioprospecção de fungos endofíticos de plantas de ambientes pouco explorados e *hotspots* de biodiversidade (Amazônia e manguezais) é uma estratégia prolífica para descoberta de novos microrganismos com capacidade de produção de enzimas de elevado valor biotecnológico, tais como celulasas e hemicelulasas.

Palavras-chave: *Saccharum*, autohidrólise, organosolv, sacarificação, fungos filamentosos, endófitos, expansinas, força tênsil, proteína recombinante, *Komagataella phaffii*.

ABSTRACT

The production of renewable energy and chemicals from lignocellulosic biomass bioconversion is an alternative to minimize the use of fossil fuels and to add value to different production chains. The increasing use of enzymes in lignocellulose biorefineries is dependent on a constant innovation process aiming at a better performance and reduction of the cost of obtaining the enzymes. One of the barriers encountered by hydrolytic enzymes is the recalcitrance of the plant cell wall, more specifically the cellulose structure. Many of the enzymatic activities required by the industrial process depend on the sum of different synergistic enzymes. In this context, the objective of this study was to evaluate a collection of 291 endophytic fungi of *Paullinia cupana* (guaranazeiro) and *Rhizophora mangle* (red mangrove) for their ability to produce effective enzymatic extracts for deconstruction of pretreated sugarcane biomass, the main raw material for the development of bioeconomy in Brazil. In addition, in the present study two sugarcane β -expansins, previously identified as having specificity in the stem of adult plants (SacEXP49 and SacEXP82) were successfully expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* X-33. And some basic aspects of its function were investigated using microcrystalline cellulose binding assay, determination of tensile strength of filter paper treated with recombinant β -expansins and organosolv pretreated sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis assays using commercial cellulases. The results showed that recombinant SacEXP49 and SacEXP82 β -expansins have no hydrolytic activity on filter paper and are capable of binding to microcrystalline cellulose. These recombinant β -expansins showed no synergism with cellulases in the enzymatic hydrolysis of pretreated bagasse under the reaction conditions used. However, they significantly altered the tensile strength of filter paper fibers compared to BSA (bovine serum albumin, negative control) and urea equivalent (positive control). These results reveal the potential of these proteins as a renewable bioproduct for cellulose-based industry applications that depend on changes in the physical properties of fibers to obtain derived products with distinct characteristics. Regarding the selection of enzyme-producing fungi for deconstruction of lignocellulose present in pretreated sugarcane bagasse, the prospecting strategy used led to the selection of the *Talaromyces amestolkiae* CP-230 strain. The crude enzymatic extracts of this fungus, obtained from non-optimized cultivation in submerged fermentation with sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis or organosolv and applied as catalysts in the saccharification of these biomasses were as efficient in the release of glucose as the commercial enzyme Cellic CTec 3 under the conditions used (5.0% solids content; 3.3 FPU/g biomass; 50°C; 200 rpm; 24 hours). These results show that bioprospecting of endophytic fungi from underexplored plants and biodiversity hotspots (Amazon and mangroves) is a prolific strategy for the discovery of new microorganisms capable of producing enzymes with high biotechnological value, such as cellulases and hemicellulases.

Keywords: *Saccharum*, autohydrolysis, organosolv, saccharification, filamentous fungi, endophytes, expansin, tensile strength, recombinant protein, *Komagataella phaffii*.

Sumário

I - LISTA DE FIGURAS	8
II- LISTA DE TABELAS	12
III- LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	13
1. INTRODUÇÃO	15
OBJETIVO GERAL	18
Objetivos específicos	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. BIORREFINARIAS DE LIGNOCELULOSE	18
2.2. ESTRUTURA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	21
2.3. DESCONSTRUÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	22
2.3.1. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	22
2.3.2. Principais enzimas e seu modo de ação na desconstrução de biomassa lignocelulósica	26
2.3.2.1. Celulases	28
2.3.2.2. Hemicelulases	29
2.3.2.3. Pectinases	30
2.3.2.4. Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs)	30
2.3.2.5. Expansinas e expansinas-like	32
2.4. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE EXPANSINAS E DE EXPANSINAS-LIKE POR <i>Pichia pastoris</i>	34
2.5. PRODUÇÃO <i>ON-SITE</i> DE ENZIMAS POR FUNGOS UTILIZANDO BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PRÉ-TRATADA COMO FONTE DE NUTRIENTES	36
2.6. FUNGOS ENDOFÍTICOS	38
2.6.1. Características gerais	38
2.6.2. Bioprospecção de fungos endofíticos para produção de enzimas industriais	38
2.7. REFERÊNCIAS	43
3. PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>PAULLINIA CUPANA</i> E <i>RHIZOPHORA MANGLE</i> NO BRASIL REVELA NOVAS CEPAS ADEQUADAS PARA A DESCONSTRUÇÃO EFICIENTE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	57
3.1. INTRODUÇÃO	59
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	62

3.2.1. Fungos utilizados, determinação de viabilidade e pureza	62
3.2.2. Caracterização molecular de fungos endofíticos de <i>P. cupana</i> e <i>R. mangle</i>	63
3.2.2.1. Cultivo e extração de ácidos nucléicos	63
3.2.2.2. Amplificação por PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico e de outros genes, purificação dos produtos e sequenciamento	64
3.2.2.3. Análise de sequências	66
3.2.3. Caracterização enzimática de fungos endofíticos de <i>P. cupana</i> e <i>R. mangle</i>	66
3.2.3.1. Triagem primária: avaliação de 291 cepas quanto à capacidade de degradação de polissacarídeos em meio de cultura sólido	66
3.2.3.2. Triagem secundária: obtenção de extrato enzimático (secretoma) de cepas selecionadas, dosagem de atividades enzimáticas e análise de desempenho dos extratos na hidrólise de biomassa lignocelulósica	69
Obtenção de extratos enzimáticos brutos (secretomas) de fungos selecionados	69
Determinação de proteína total dos extratos enzimáticos	70
Atividades enzimáticas	71
Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise	73
3.2.3.3. Caracterização enzimática e desempenho de hidrólise do extrato enzimático (secretoma) produzido por <i>Talaromyces amestolkiae</i> CP-230 após cultivo em dois tipos de bagaço de cana pré-tratado	74
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.3.1. Classificação taxonômica de uma coleção de fungos endofíticos de <i>P. cupana</i> e <i>R. mangle</i> por meio de análise de sequência da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico	76
3.3.2. Capacidade de degradação de polissacarídeos em meio de cultura sólido de 291 fungos endofíticos de <i>P. cupana</i> e <i>R. mangle</i> e seleção de cepas produtoras de enzimas	78
3.3.3. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por 27 fungos endofíticos em cultivo submerso com bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise como fonte de carbono	86
3.3.4. Desempenho de hidrólise do extrato enzimático bruto (secretoma) de 16 linhagens de fungos endofíticos de <i>P. cupana</i> e <i>R. mangle</i>	97
3.3.5. Análise dos extratos enzimáticos brutos obtidos dos cultivos de <i>T. amestolkiae</i> CP230 na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise e organosolv	100
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
3.5. REFERÊNCIAS	116
4. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DAS β-EXPANSINAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SACEXP49 E SACEXP82 E SUA APLICAÇÃO PARA MODIFICAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DA CELULOSE	123
4.1. INTRODUÇÃO	125
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	130
4.2.1. Modificação genética de <i>P. pastoris</i> X-33 para produção das β-expansinas de cana-de-açúcar SacEXP49 e SacEXP82	130
4.2.2. Cultivo de transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 e análise de perfil proteico via eletroforese em gel de	

poliacrilamida (SDS-PAGE)	135
4.2.3. Identificação de proteínas heterólogas por espectrometria de massas	137
4.2.4. Ensaio de ligação à celulose microcristalina	137
4.2.5. Avaliação da atividade hidrolítica de β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar	138
4.2.6. Efeito das β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar na sacarificação de substratos celulósicos	138
4.2.7. Determinação da resistência à tração e deformação do papel filtro tratado com β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar	139
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
4.3.1. <i>P. pastoris</i> é um hospedeiro adequado para expressão de β -expansinas da cana-de-açúcar	141
4.3.2. As β -expansinas recombinantes SacEXP82 e SacEXP49 não possuem atividade hidrolítica sobre papel filtro e são capazes de se ligar à celulose microcristalina	146
4.3.3. Efeito das β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar na sacarificação enzimática de substratos celulósicos	150
4.3.4. Determinação da força tênsil e deformação de papel filtro tratado com as expansinas recombinantes de cana-de-açúcar SacEXP82 e SacEXP49	152
4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	154
4.5. REFERÊNCIAS	155
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	163
ANEXO	165
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	165
PATENTES E REGISTROS	166

I - LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** PROCESSO DE CONVERSÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM UMA BIORREFINARIA, COM FOCO NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL. FONTE: FATMA ET AL. (2018). 16
- FIGURA 2.** REPRESENTAÇÃO SIMPLICADA DE UMA BIORREFINARIA DE LIGNOCELULOSE, FOCADA NA PLATAFORMA DE AÇÚCARES. O AÇÚCAR É GERADO A PARTIR DA BIOMASSA SUBMETIDA À ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO E DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. OS AÇÚCARES OBTIDOS PODEM SER CONVERTIDOS EM DIVERSOS PRODUTOS OU INSUMOS, PELO USO DE DIFERENTES TECNOLOGIAS (ADAPTADO DE BRETHAUER & STUDER, 2015). 19
- FIGURA 3.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PAREDE CELULAR VEGETAL, MOSTRANDO SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES. A FIGURA ILUSTRA A CÉLULA VEGETAL EM CORTE TRANSVERSAL SENDO POSSÍVEL EVIDENCIAR O NÚCLEO E VACÚOLO. NA PAREDE CELULAR VEGETAL É POSSÍVEL OBSERVAR A ESTRUTURA DE UMA MICROFIBRILA DE CELULOSE COMPOSTA POR VÁRIAS MOLÉCULAS DE CELULOSE. UMA DAS MOLÉCULAS DE CELULOSE SE APRESENTA AUMENTADA E PROLONGADA, MOSTRANDO AS UNIDADES DE GLICOSE LIGADAS ENTRE SI POR LIGAÇÕES DO TIPO BETA-1,4. UMA DAS MOLÉCULAS COMPONENTES DA HEMICELULOSE (GLUCURONOARABINOXILANO) TAMBÉM É MOSTRADA EM DETALHE NA PARTE SUPERIOR DA FIGURA. FONTE: BUCKERIDGE ET AL. (2014). 21
- FIGURA 4.** ESQUEMA DO EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO EM MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS. FONTE: LEE ET AL. (2014). 23
- FIGURA 5.** PRINCIPAIS ENZIMAS QUE ATUAM NA CLIVAGEM DA CELULOSE. EG: ENDOGLICANASES AGINDO DE FORMA ALEATÓRIA NA REGIÃO AMORFA DA CELULOSE, LIBERANDO TERMINAIS REDUTORES E NÃO REDUTORES PARA O PROCESSAMENTO DAS EXOGLICANASES. CBM: MÓDULO DE LIGAÇÃO A CARBOIDRATO, O QUAL RECONHECE E PROMOVE A LIGAÇÃO DAS CBHS AO SUBSTRATO. CBH1: EXOGLICANASE ATUANDO NA EXTREMIDADE REDUTORA DA CELULOSE. CBH2: EXOGLICANASE ATUANDO NA EXTREMIDADE NÃO-REDUTORA, AMBAS LIBERANDO CELOBIOSE. B-GLICOSIDASE: ENZIMA QUE CONVERTE A CELOBIOSE EM MONÔMEROS DE GLICOSE. LPMO: MONO-OXIGENASE LÍTICA DE POLISSACARÍDEO PROMOVENDO A OXIDAÇÃO DA PORÇÃO CRISTALINA DA CELULOSE NO CARBONO C1 E C4, RESPECTIVAMENTE, LIBERANDO TERMINAIS REDUTORES E NÃO REDUTORES PARA POSTERIOR ATUAÇÃO DAS EXOGLICANASES. EXPANSINAS: ROMPEM AS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO ENTRE OS POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR SEM ATIVIDADE HIDROLÍTICA, AFROUXANDO-A. FONTE: HORN ET AL. (2012). 27
- FIGURA 6.** SINERGISMO ENTRE ENDOGLICANASES, EXOGLICANASES E CELOBIASES NA DESPOLIMERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DA CELULOSE. FONTE: FARINAS (2011). 28
- FIGURA 7.** PRINCIPAIS AÇÚCARES COMPONENTES DA ESTRUTURA HETEROGÊNEA DAS HEMICELULOSES. FONTE: BRANDT ET AL. (2013). 29
- FIGURA 8.** ESTRUTURA DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS AOS DOIS DOMÍNIOS DAS EXPANSINAS DE PLANTAS. (A) DOMÍNIO DE EXPANSINA 1 (A FIGURA MOSTRA O DOMÍNIO CATALÍTICO DE UMA ENDOGLICANASE DA FAMÍLIA GH45 DO FUNGO FILAMENTOSO ASCOMICETO HUMICOLA INSOLENS; COM O DOMÍNIO DOUBLE-PSI BETA-BARREL - DPBB; OS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS QUE SÃO CONSERVADOS EM EXPANSINAS ESTÃO INDICADOS NO CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS (LETRAS). (B) DOMÍNIO DE EXPANSINA 2 (A FIGURA MOSTRA UMA PROTEÍNA G2A DE PHLEUM PRATENSE, A QUAL É UM TIPO DE ALÉRGENO DE PÓLEN DE GRAMÍNEAS DO GRUPO 2). FONTE: SAMPEDRO & COSGROVE (2005). 32
- FIGURA 9.** ESQUEMA DE AFROUXAMENTO DA PAREDE CELULAR VEGETAL PELA AÇÃO DE EXPANSINAS (ESTRUTURA EM COR AZUL NAS FIGURAS A, B E C). AS MICROFIBRILAS DE CELULOSE SÃO CONECTADAS UMAS ÀS OUTRAS POR GLICANOS (FITAS AMARELAS E VERMELHAS) QUE PODEM ADERIR NA SUPERFÍCIE DA MICROFIBRILA E ENTRE SI. A HIPÓTESE É TAL QUE A EXPANSINA (AZUL) PODE PERTURBAR A LIGAÇÃO DOS GLICANOS À SUPERFÍCIE DA MICROFIBRILA (A) OU ENTRE SI (B). SOB O ESTRESSE MECÂNICO RESULTANTE DO TURGOR, A AÇÃO DA EXPANSINA RESULTA EM UM DESLOCAMENTO DOS POLÍMEROS DA PAREDE (C) E DESLIZA NOS PONTOS DE ADESÃO DO POLÍMERO (COMPARAÇÃO ENTRE A E C). FONTE: COSGROVE (2000). 33
- FIGURA 10.** PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5.8S-ITS2 DO RDNA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE. A PRIMEIRA CANALETA À ESQUERDA REPRESENTA O MARCADOR DE PESO MOLECULAR LOW MASS DNA LADDER

- (INVITROGEN). A NUMERAÇÃO CORRESPONDENTE ÀS SEGUINTEs CEPAS: 129 (EP 565), 130 (EP 613), 142 (EP 608), 243(31G), 265 (RZ487*), 273 (RZ 464), 274 (CED 433/1 A), 275 (RZ 491), 277 (CED 389B), 278 (CE 93*), 279 (EP558), 280 (CE 101 OU 161*), 281 (EP 541), 282 (EP 600*), 283(RZ 491 NOVO), 286 (RZ 521), 290 (CE 101), 294 (EP 593), 295 (EP 596). OS ASTERISCOS SÃO DENOMINAÇÕES QUE VIERAM NOS CÓDIGOS DAS CEPAS, NÃO REPRESENTAM NENHUM SIGNIFICADO. 76
- FIGURA 11.** PORCENTAGEM DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE (TOTAL DE 291 LINHAGENS) QUE APRESENTARAM ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE) > 1 QUANDO CULTIVADOS POR 6 DIAS A 25°C EM MEIO SÓLIDO CONTENDO DIFERENTES POLISSACARÍDEOS COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO. CARBOXIMETILCELULOSE (CMC), XILANA, PECTINA (PH 5,0), PECTINA (PH 7,0) E AMIDO SÃO SUBSTRATOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO PREFERENCIALMENTE DE ENDOGLICANASE, XILANASE, POLIGALACTURONASE, PECTINA LIASE E AMILASE. 79
- FIGURA 12.** REPRESENTAÇÃO GRÁFICA (HEATMAP) DOS VALORES DE ÍNDICE ENZIMÁTICO (MÉDIAS) DE 27 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE SELECIONADOS PARA CONTINUIDADE DA BIOPROSPECÇÃO VISANDO À SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE EXTRATO ENZIMÁTICO EFICIENTE PARA HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. A CLASSIFICAÇÃO APRESENTADA FOI BASEADA NA ANÁLISE DOS GENES ITS1-5,8S-ITS2, EF1 α E ACTINA CONTRA DIFERENTES BASES DE DADOS. #FUNGOS DE R. MANGLE; *FUNGOS DE P. CUPANA. 84
- FIGURA 13.** REPRESENTAÇÃO GRÁFICA (HEATMAP) DOS VALORES MÉDIOS DE DIÂMETRO (MM) DAS COLÔNIAS APÓS CRESCIMENTO EM MEIO MÍNIMO CONTENDO AVICEL PH-101 COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO DE 27 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE SELECIONADOS PARA CONTINUIDADE DA BIOPROSPECÇÃO VISANDO À SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE EXTRATO ENZIMÁTICO EFICIENTE PARA HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPPLICATA E OS FUNGOS FORAM INCUBADOS POR 4 DIAS A 25°C. A CLASSIFICAÇÃO APRESENTADA FOI BASEADA NA ANÁLISE DOS GENES ITS1-5,8S-ITS2, EF1 α E ACTINA CONTRA DIFERENTES BASES DE DADOS. #FUNGOS DE R. MANGLE; *FUNGOS DE P. CUPANA. 85
- FIGURA 14.** FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA POTATO GLUCOSE AGAR DURANTE 20 DIAS A 25°C, EXCETO AS LINHAGENS CED413 E CED414, CULTIVADAS EM PDA POR 7 DIAS A 25°C. AS LINHAGENS ESTÃO IDENTIFICADAS COM SEUS RESPECTIVOS CÓDIGOS. 87
- FIGURA 15.** VALORES DE FPASE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE 27 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE APÓS 7 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE MANDELS E WEBER SUPLEMENTADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE E FARELO DE TRIGO. OS VALORES FORAM COMPARADOS COM T. REESEI RUT-C30. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIAS DE TRÊS REPETIÇÕES. A ÚLTIMA LINHAGEM NO GRÁFICO É A CEPA DEREFERÊNCIA HIPERCELULOLÍTICA T. REESEI RUT-C30. 89
- FIGURA 16.** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE B-GLICOSIDASE DO EXTRATO BRUTO DE 27 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE APÓS 7 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE MANDELS E WEBER SUPLEMENTADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE E FARELO DE TRIGO. OS VALORES FORAM COMPARADOS COM T. REESEI RUT-C30. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIAS DE TRÊS REPETIÇÕES. A ÚLTIMA LINHAGEM NO GRÁFICO É A CEPA DE REFERÊNCIA HIPERCELULOLÍTICA T. REESEI RUT-C30. 90
- FIGURA 17.** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XILANASE DO EXTRATO BRUTO DE 27 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE APÓS 7 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE MANDELS E WEBER SUPLEMENTADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE E FARELO DE TRIGO. OS VALORES FORAM COMPARADOS COM T. REESEI RUT-C30. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIAS DE TRÊS REPETIÇÕES. A ÚLTIMA LINHAGEM NO GRÁFICO É A REFERÊNCIA HIPERCELULOLÍTICA T. REESEI RUT-C30. 91
- FIGURA 18.** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ENDOGLICANASE DO EXTRATO BRUTO DE 27 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE APÓS 7 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE MANDELS E WEBER SUPLEMENTADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE E FARELO DE TRIGO. OS VALORES FORAM COMPARADOS COM T. REESEI RUT-C30. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIAS DE TRÊS REPETIÇÕES. A ÚLTIMA LINHAGEM NO GRÁFICO É A REFERÊNCIA HIPERCELULOLÍTICA T. REESEI RUT-C30. 92

- FIGURA 19.** DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL DO EXTRATO BRUTO DE 27 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE APÓS 7 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE MANDELS E WEBER SUPLEMENTADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE E FARELO DE TRIGO. OS VALORES FORAM COMPARADOS COM T. REESEI RUT-C30. OS VALORES REPRESENTAM MÉDIAS DE TRÊS REPETIÇÕES. A ÚLTIMA LINHAGEM NO GRÁFICO É A REFERÊNCIA HIPERCELULOLÍTICA T. REESEI RUT-C30..... 93
- FIGURA 20.** DISPERSÃO DE GLICOSE LIBERADA E FPU/G DE MASSA SECA PARA CADA UM DOS 16 EXTRATOS AVALIADOS. PARA O CONJUNTO DE DADOS FOI CALCULADO O COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO PRODUTO-MOMENTO ($R=0,51$), INDICANDO NÃO EXISTE UMA FORTE DEPENDÊNCIA LINEAR ENTRE AS VARIÁVEIS..... 98
- FIGURA 21.** CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, XILOSE E CELOBIOSE (G/L) OBTIDA APÓS 24 HORAS DE REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE, UTILIZANDO 16 EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS (SECRETOMA) PROVENIENTES DO CULTIVO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE EM MEIO DE MANDELS E WEBER COM FARELO DE TRIGO E BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE SECO E MOÍDO. OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA DE TRIPLICATAS E AS BARRAS DE ERRO, O DESVIO PADRÃO. AS MÉDIAS IDENTIFICADAS POR UMA MESMA LETRA, PARA UMA MESMA RESPOSTA, NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE SEGUNDO TESTE DE TUKEY ($P>0,005$). 99
- FIGURA 22.** A. CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES LIBERADA APÓS 24 H DE REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA (5% DE SÓLIDOS, 3,3 FPU/G) DE BIOMASSA PRÉ-TRATADA POR A) AUTOHIDRÓLISE E B) ORGANOSOLV. O DESEMPENHO DOS EXTRATOS CP230-H (CULTIVO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE), CP230-O (CULTIVO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR ORGANOSOLV) E CELLIC® CTEC 3 FOI COMPARADO, EM PARES, POR TESTE T DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS COM NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DE 5%. EM A), CP230-H = CP230-O; CP230-H = CELLIC® CTEC; CP230-O = CELLIC® CTEC. EM B), CP230-H = CP230-O; CP230-H = CELLIC® CTEC; CP230-O = CELLIC® CTEC..... 101
- FIGURA 23.** EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO MECÂNICO PARA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E DEFORMAÇÃO DO PAPEL FILTRO TRATADO COM B-EXPANSINAS RECOMBINANTES DA CANA-DE-AÇÚCAR. PRIMEIRA IMAGEM MOSTRA AS AMOSTRAS INCUBADAS POR 30 MIN A 30°C E 50°C. O COMPUTADOR EM QUE AS ANÁLISES SÃO CALCULADAS QUANTO À FORÇA TÊNSIL, O EQUIPAMENTO MÁQUINA UNIVERSAL EM QUE FOI COLOCADA A TIRA DE PAPEL UMEDECIDA PELO EXTRATO PROTEICO CONTENDO A EXPANSINA RECOMBINANTE E A ÚLTIMA IMAGEM O PAPEL SENDO EXTENDIDO ATÉ SOFRER A PRIMEIRA RUPTURA..... 140
- FIGURA 24.** ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR OBTIDOS PARA TRANSFORMANTES RESISTENTES À ZEOCINA CONTENDO OS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES PPICZB_SACEXP82 E PPICZB_SACEXP49, UTILIZANDO OS INICIADORES 5' AOX1 E 3' AOX1. AS AMPLIFICAÇÕES PRODUZIRAM UMA BANDA DE APROXIMADAMENTE 1.200 PB, CONTENDO O GENE ALVO, E UMA BANDA DE APROXIMADAMENTE 2.200 PB CORRESPONDENTE AO GENE AOX1, COMO ESPERADO. NA FIGURA A, AS LINHAS P1 - P10 REPRESENTAM TRANSFORMANTES DE P. PASTORIS X-33 CONTENDO O PLASMÍDIO PPICZB_SACEXP82. NA FIGURA B, AS LINHAS P1 – P5 REPRESENTAM TRANSFORMANTES DE P. PASTORIS X-33 CONTENDO PPICZB_SACEXP49. OBSERVE QUE P2 DE PPICZB_SACEXP49 MOSTRA UM TAMANHO DIFERENTE QUE NÃO ERA ESPERADO (POR VOLTA DE 1500 PB) E FOI DESCARTADO DA ANÁLISE..... 141
- FIGURA 25.** ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) DOS SOBRENADANTES DOS TRANSFORMANTES DE P. PASTORIS X-33 APÓS 72 HORAS DE INDUÇÃO COM METANOL. OS SOBRENADANTES DOS TRANSFORMANTES P1, P3 E P5 (P4 NÃO CRESCERAM) CONTENDO O PLASMÍDEO RECOMBINANTE PPICZB_SACEXP49 SÃO MOSTRADOS NAS CANALETAS 2 A 4. A CANALETA 1 APRESENTA O SOBRENADANTE DA CEPA CONTROLE DE P. PASTORIS X-33 CONTENDO O VETOR PPICZB VAZIO (CONTROLE NEGATIVO)..... 142
- FIGURA 26.** PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DOS CULTIVOS APÓS INDUÇÃO COM METANOL. A FIGURA DA ESQUERDA MOSTRA O SOBRENADANTE DO TRANSFORMANTE P4 DE P. PASTORIS X-33 (PPICZB_SACEXP82) CULTIVADO EM BIORREATOR. A FIGURA DA DIREITA MOSTRA O SOBRENADANTE DO TRANSFORMANTE P2 DE P. PASTORIS X-33 (PPICZB_SACEXP49) CULTIVADO EM FRASCOS CÔNICOS DE 1 L. AS SETAS INDICAM AS PROVÁVEIS PROTEÍNAS HETERÓLOGAS SECRETADAS, QUE NÃO APARECEM NO CONTROLE; E M REPRESENTA PRECISION PLUS PROTEIN™ DUAL XTRA-

BIO-RAD STANDARD.....	143
FIGURA 27. ANÁLISE DE SDS-PAGE DO SOBRENADANTE DO CULTIVO DO TRANSFORMANTE PPICZB_SACEXP82 P4 EM LIGAÇÃO COM SUBSTRATO CELULÓSICO (AVICEL PH-101) A 25°C A 900 RPM OVERNIGHT. DA ESQUERDA PARA DIREITA M: MARCADOR (KDA) PRECISION PLUS PROTEIN™ DUAL XTRA STANDARD – BIO-RAD (CRITERION 10- 20% TRIS-TRICINE). P4: SOBRENADANTE DO CULTIVO DO TRANSFORMANTE P4 SEM AVICEL (CONTROLE), P4 (S): P4 APÓS TRATAMENTO COM AVICEL CONTENDO PROTEÍNAS QUE NÃO SE LIGARAM AO SUBSTRATO, P4(B): BANDA PUTATIVA (SACEXP82) ELUÍDA DE AVICEL. PC: SOBRENADANTE DO CULTIVO DO TRANSFORMANTE CONTROLE COM VETOR PPICZB VAZIO SEM AVICEL, PC(S): PC APÓS TRATAMENTO COM AVICEL E PC(B) PROTEÍNAS ELUÍDAS DE AVICEL. NOS POÇOS P4, P4 (S), PC, PC(S) FORAM APLICADOS 40 µG DE PROTEÍNA TOTAL E NOS POÇOS P4 (B) E PC (B) TODO O MATERIAL ELUÍDO A PARTIR DE AVICEL FOI CONCENTRADO POR SPEEDVAC E APLICADO NO GEL. A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL FOI ESTIMADA PELO MÉTODO DO ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA). AS AMOSTRAS FORAM RESOLVIDAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM MALHA DE 12%....	147
FIGURA 28. ANÁLISE POR SDS-PAGE DA ADSORÇÃO DAS B-EXPANSINAS DE CANA-DE-AÇÚCAR RECOMBINANTES SACEXP82 E SACEXP49 EM CELULOSE MICROCRISTALINA AVICEL PH-101. M: MARCADOR MOLECULAR (THERMO SCIENTIFIC PAGERULER PRESTAINED PROTEIN LADDER). FORAM ADICIONADOS 30 µG DE PROTEÍNA DO EXTRATO PROTEICO CONCENTRADO E DIALISADO DO TRANSFORMANTE PPICZB_SACEXP82(P4). AS CANALETAS 3 E 4 INDICAM A SACEXP82 ADSORVIDA A AVICEL A 30°C E 50°C, RESPECTIVAMENTE, APÓS 24 H. FORAM ADICIONADOS 30 µG DE PROTEÍNA DO EXTRATO PROTEICO CONCENTRADO E DIALISADO DO TRANSFORMANTE PPICZB_SACEXP49 (P1). AS CANALETAS 6 E 7 INDICAM A SACEXP49 ADSORVIDA A AVICEL A 30°C E 50°C, RESPECTIVAMENTE, APÓS 24 H.	148
FIGURA 29. EFEITO DA ADIÇÃO DE B-EXPANSINAS RECOMBINANTES NA SACARIFICAÇÃO DE CANA TRATADO PELO PROCESSO ORGANOSOLV. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS COM 5 MG.ML ⁻¹ DE BIOMASSA INCUBADA A 900 RPM E 30°C. NO ENSAIO DE PRÉ-TRATAMENTO, A BIOMASSA FOI INCUBADA COM EXTRATOS PROTEICOS CONCENTRADOS OU BSA (10 MG/G) POR 24 H. APÓS INCUBAÇÃO, CELLUCLAST (1,2 FPU/G) FOI ADICIONADA E A REAÇÃO MANTIDA NA MESMA TEMPERATURA POR 24 H. EM ENSAIOS DE SINERGISMO, EXTRATOS PROTEICOS CONCENTRADOS OU BSA FORAM ADICIONADOS EM COMBINAÇÃO COM CELLUCLAST E INCUBADOS POR 24 H. OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA, BARRAS DE ERRO INDICAM AS MÉDIAS ± DESVIO PADRÃO.	151
FIGURA 30. COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO (TENSÃO MÁXIMA EM MPA) DO SUBSTRATO CELULÓSICO (PAPEL FILTRO WHATMAN Nº 3) TRATADO COM BSA (CONTROLE NEGATIVO), SACEXP49, SACEXP82 E URÉIA (CONTROLE POSITIVO) EM PH 4,8, 30°C POR 1 HORA. MÉDIAS SEGUIDAS DE LETRAS IGUAIS NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY (COM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%). PELO MENOS CINCO TIRAS DE PAPEL FORAM USADAS PARA CADA CONDIÇÃO. AS BARRAS DE ERRO REPRESENTAM O DESVIO PADRÃO DA MEDIÇÃO.	152

II- LISTA DE TABELAS

TABELA 1. SUMÁRIO DAS VANTAGENS E DESVANTAGENS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS (FONTE: WYMAN ET AL., 2005).....	24
TABELA 2. PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE EXPANSINAS PROVENIENTES DE PLANTAS* E DE EXPANSINAS-LIKE DE FUNGOS** E DE BACTÉRIAS*** DE DIFERENTES ESPÉCIES.....	35
TABELA 3. ESTUDOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEU POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PARA DESCONSTRUÇÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (ADAPTADO DE SOUSA, 2017).	41
TABELA 4. MEIO DE CULTURA DE MANDELS & WEBER (1969) UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PELOS FUNGOS SELECIONADOS NO PRESENTE TRABALHO.....	70
TABELA 5. DIÂMETRO DE CRESCIMENTO DE 291 LINHAGENS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE P. CUPANA E R. MANGLE EM MEIO CONTENDO CELULOSE MICROCRISTALINA (AVICEL PH-101) COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO, APÓS 4 DIAS DE CRESCIMENTO A 25°C. *TESTE DE SCOTT-KNOTT A 5% (P=0,005, 95%) DE NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA.	81
TABELA 6. ATIVIDADES ESPECÍFICAS DE FPASE, XILANASE, B-GLICOSIDASE E ENDOGLICANASE DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS DAS 27 LINHAGENS SELECIONADAS (UI/MG). OS VALORES REPRESENTAM AS MÉDIAS DE 3 REPETIÇÕES.....	94
TABELA 7. VALORES DE FPU/G DOS 27 EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO. EM NEGRITO ESTÃO MARCADOS OS 16 EXTRATOS QUE PROSSEQUIRAM NA BIOPROSPECÇÃO, COM FOCO NA ANÁLISE DE SEU DESEMPENHO DE HIDRÓLISE.	97
TABELA 8. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL DOS EXTRATOS BRUTOS DO FUNGO T. AMESTOLKIAE CP230, EM QUE CP230-H (CULTIVADO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR AUTOHIDRÓLISE), E CP230-O (CULTIVADO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR ORGANOSOLV). OS VALORES REPRESENTAM A MÉDIA DE TRIPLICATAS SEGUIDAS PELO DESVIO PADRÃO. OS RESULTADOS FORAM COMPARADOS POR TESTE T (COMPARAÇÃO DE MÉDIAS).....	100
TABELA 9. ORIGEM E CARACTERÍSTICAS DAS EXPANSINAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SELECIONADOS PARA ESTUDO.....	130
TABELA 10. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LÍQUIDO SOC.....	131
TABELA 11. REAÇÕES DE CLIVAGEM COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDIOS PPICZB-SACEXP49 E PPICZB-SACEXP82.	132
TABELA 12. REAÇÃO DE CLIVAGEM COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO PARA LINEARIZAÇÃO DOS PLASMÍDIOS PPICZB-SACEXP49 E PPICZB-SACEXP82.....	133
TABELA 13. REAÇÃO DE PCR PARA CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DOS GENES DE INTERESSE NO GENOMA DE P. PASTORIS X-33.....	134
TABELA 14. VALORES COMPARATIVOS DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO DE PAPEL FILTRO ENCONTRADOS PARA ALGUMAS EXPANSINAS E SUA COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS NO PRESENTE TRABALHO#.....	153

III- LISTA DE SÍMBOLOS e ABREVIACÕES

AA: Atividade auxiliar

AOX: Proteína álcool oxidase

APS: Persulfato de amônio

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BMGY: Buffered Glycerol-complex Medium

BMMY: Buffered Methanol-complex Medium

bp: Pares de bases

BSA: Proteína albumina do soro bovino

C: Graus Celsius

CBH: Celobiohidrolase

CBM: Módulo de ligação ao carboidrato

CDH: Celobiose desidrogenase

CGEN: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CMC: Carboximetilcelulose

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DNS: Ácido 3,5-dinitro-salicílico

dNTP: Deoxinucleotídeo trifosfatado

DO_{600nm}: Densidade óptica a 600 nm

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra-acético

EG: Endoglicanase

GAP: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GH: Glicosil hidrolase

His: histidina

HPLC: High performance liquid chromatography; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

ITS: Internal transcribed spacer; Espaçador transcrito interno

Kb: Quilo base

KDa: Quilo Dalton

KOH: Hidróxido de potássio

Kv: Quilovolt

L: Litro

LB: Luria-Bertani

LPMO: lytic polysaccharide monoxygenase; mono-oxigenase lítica de polissacarídeos

M: Molar

mg: Miligrama

min: Minuto

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mm: Milímetro

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NH₄OH: Hidróxido de amônio

p/v: peso por volume

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: Polibutadieno-Estireno

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDA: Potato dextrose ágar

PG: poligalacturonase

pH: Potencial hidrogeniônico

RNase A: Ribonuclease A

rpm: Rotações por minuto

s: Segundo

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida

TAE: Tampão TRIS-Acetato-EDTA

TCA: Ácido tricloroacético

U: Unidade

UI: Unidade Internacional

UV: Radiação ultravioleta

V: Volts

v: Volume

V_{máx}: velocidade máxima da reação

YNB: Yeast nitrogen base

YPD: Yeast extract peptone dextrose

YPDS: Yeast extract peptone dextrose sorbitol

1. INTRODUÇÃO

O crescimento do uso de tecnologias de conversão de biomassa lignocelulósica traz o termo biorrefinaria como uma abordagem alternativa viável para conversão efetiva dessa matéria-prima em bioenergia e produtos químicos renováveis. O conceito de biorrefinaria prevê a produção de diversos produtos a partir da biomassa vegetal (renovável), semelhante ao que ocorre nas refinarias que produzem vários produtos derivados do petróleo (não renovável) (DEMIRBAS, 2009). Nesse contexto, embora algumas biorrefinarias de lignocelulose tenham entrado em operação comercial nos últimos anos no Brasil e no mundo, a desconstrução eficiente dos componentes da biomassa lignocelulósica ainda apresenta desafios técnicos e econômicos. Os desafios consistem no desenvolvimento de tecnologias eficazes para conversão dos componentes desta biomassa em diferentes produtos.

Entre os principais produtos de uma biorrefinaria de lignocelulose está o etanol. Para obtenção deste biocombustível, embora existam diferentes configurações de processamento da biomassa, três etapas são comuns: pré-tratamento, hidrólise e fermentação. O pré-tratamento reduz a recalcitrância da biomassa e facilita o processo de hidrólise. Na hidrólise, a celulose e a hemicelulose (dependendo do pré-tratamento) são degradadas por enzimas a seus monômeros. Na fermentação os açúcares são convertidos a etanol (PARACHIN & ALMEIDA, 2013). Nesse contexto, a sacarificação continua a ser um desafio devido ao alto custo de enzimas para bioconversão dos componentes da biomassa. A recalcitrância da celulose é um dos fatores limitantes para a hidrólise enzimática. A celulose é um polímero constituído de resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4. A cristalinidade da celulose é devida à uniformidade química das unidades de glicose e à formação de pontes de hidrogênio entre as microfibrilas, resultando na formação de estruturas fibrosas inacessíveis às enzimas hidrolíticas (HIMMEL et al., 2007). A Figura 1 exemplifica as principais etapas do processamento da biomassa lignocelulósica para produção de biocombustível em uma biorrefinaria de lignocelulose (FATMA et al., 2018).

Biorrefinarias de lignocelulose integram processos de obtenção de produtos como biocombustíveis, energia, materiais e produtos químicos tendo como desafio maximizar o valor dos derivados da matéria-prima, minimizar os resíduos e diminuir a dependência de carbono fóssil nos processos produtivos. Além disso, as biorrefinarias buscam minimizar os impactos ocasionados pelo crescimento populacional, como a falta de recursos ambientais e os impactos econômicos e políticos (BRETHAUER & STUDER, 2015; CAREY et al., 2016).

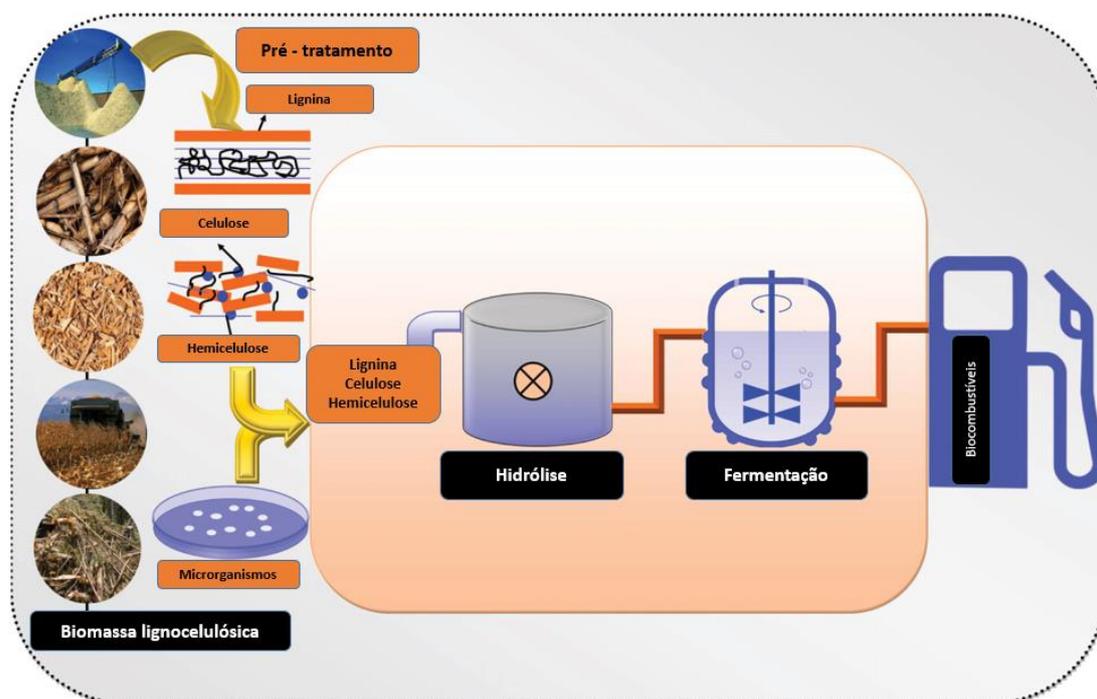


Figura 1. Processo de conversão de biomassa lignocelulósica em uma biorrefinaria, com foco na produção de biocombustível. Fonte: FATMA et al. (2018).

Diversos produtos químicos podem ser obtidos em biorrefinarias de lignocelulose e sua obtenção agrega valor às cadeias produtivas de biomassa, o que por sua vez permite o provimento de insumos a diversos setores tais como farmacêutico, automotivo, cosmético, agroindustrial, entre outros (VAZ JUNIOR, 2011). Por exemplo, produtos tais como ácidos orgânicos, bioplásticos, compostos bioativos, pigmentos, enzimas e agroquímicos são e/ou podem ser obtidos a partir da conversão dos componentes da biomassa, usando processos químicos ou rotas bioquímicas, fomentando o desenvolvimento de modelos de biorrefinarias integradas e a economia circular. Isso, por sua vez, depende da degradação dos componentes da lignocelulose, o que envolve especialmente o uso de enzimas lignocelulolíticas.

Atualmente, o desenvolvimento de enzimas específicas para cada tipo de biomassa (customização) tem se tornado indispensável para a viabilidade econômica das biorrefinarias de lignocelulose. Nesse aspecto, a produção *on-site* de enzimas específicas para a biomassa alvo utilizando este mesmo material como substrato de cultivo de fungos pode reduzir os custos do processo (JØRGENSEN & PINELO, 2017; NOVY et al., 2019). Vale ressaltar que nas últimas décadas, o custo das enzimas para desconstrução de biomassa lignocelulósica foi significativamente reduzido, ainda assim, é um dos fatores importantes que afetam a economia total de um processo de desconstrução de biomassa (BINOD et al., 2019).

Devido à complexidade dos diferentes componentes da biomassa lignocelulósica, são

necessárias diferentes enzimas para a desconstrução de seus materiais constituintes, incluindo celulasas, hemicelulasas, pectinases, ligninases e outras enzimas auxiliares, como mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e expansinas. Essas enzimas podem ser produzidas por uma ampla variedade de organismos, especialmente por fungos filamentosos. Dentre estes, os fungos endofíticos vêm sendo estudados e podem oferecer perspectivas para encontrar novas linhagens produtoras de enzimas lignocelulolíticas. Por estarem associados às plantas, ao longo do processo evolutivo esses fungos desenvolveram um arsenal enzimático que permite sua atuação como degradadores de polissacarídeos vegetais (SURYANARAYANAN et al., 2017).

Dentre as enzimas auxiliares na degradação de lignocelulose, as LPMOS e as expansinas ganham destaque por reduzirem a recalcitrância dos polissacarídeos, especialmente da celulose. As LPMOs atuam na estrutura cristalina da celulose e de outros polissacarídeos por um mecanismo oxidativo, tornando o substrato acessível a outras enzimas (HORN et al., 2012).

As expansinas ocorrem em diferentes organismos, especialmente em plantas e atuam no remodelamento dos componentes da parede celular vegetal, promovendo a expansão celular. Nas plantas, elas rompem as ligações não covalentes entre as microfibrilas de celulose e os demais polímeros da matriz por um mecanismo não enzimático, levando ao afrouxamento e extensão da parede celular (SAMPEDRO & COSGROVE, 2005). Devido à essas características, elas têm sido estudadas para diferentes aplicações no contexto de biorrefinarias, não somente como um aditivo para aumentar a eficiência de celulasas na sacarificação de celulose, mas também em outras aplicações que dependem da modificação das propriedades químicas e físicas da fibra celulósica.

Nesse contexto, o presente trabalho teve o propósito de agregar valor à biodiversidade de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* e *Rhizophora mangle* com o intuito de avaliar o seu potencial quanto à produção de enzimas para desconstrução da biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar. A busca central deste estudo foi a obtenção de um extrato enzimático eficiente que contenha enzimas provenientes de uma fonte nativa (enzimas fúngicas) para atuar na desconstrução de biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada por autohidrólise e organosolv, e, além disso, a obtenção e caracterização bioquímica de uma fonte recombinante (β -expansinas da própria cana-de-açúcar) contribuindo para o desenvolvimento de biorrefinarias de lignocelulose, principalmente na suplementação de coquetéis enzimáticos com aplicação na desconstrução de biomassa vegetal.

A estrutura da tese foi organizada em três partes, sendo que a primeira parte apresenta

a revisão bibliográfica sobre os principais temas do trabalho. A segunda parte é referente à bioprospecção de fungos endofíticos de plantas da Amazônia (*Paullinia cupana*) e do manguezal (*Rhizophora mangle*) e relata a descoberta de novas linhagens fúngicas da biodiversidade capazes de produzir complexos enzimáticos eficientes para desconstrução de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por autohidrólise e organosolv. A terceira parte é referente à produção recombinante de duas expansinas de cana-de-açúcar por *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) e sua caracterização funcional, com foco na sua aplicação para modificação das propriedades físicas da celulose. Por fim, também são apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

OBJETIVO GERAL

Prospectar uma coleção de fungos endofíticos de plantas da Amazônia e do manguezal visando à seleção de linhagens produtoras de extrato enzimático eficaz para desconstrução de bagaço de cana-de-açúcar, bem como obter β -expansinas recombinantes de cana-de-açúcar e caracterizá-las quanto à capacidade de modificar as propriedades físicas da celulose, no contexto de biorrefinarias.

Objetivos específicos

- Prospectar e selecionar fungos endofíticos de *Paullinia cupana* e *Rhizophora mangle* produtores de enzimas degradadoras de polissacarídeos.
- Obter extrato enzimático eficaz para a degradação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por autohidrólise e organosolv a partir de cepa fúngica selecionada.
- Obter novas expansinas (β -expansinas de cana-de-açúcar) produzidas de forma recombinante e caracterizá-las quanto ao seu potencial de atuação como proteínas auxiliares na desconstrução de biomassa de cana-de-açúcar ou como bioproduto para alteração das propriedades físicas da celulose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIORREFINARIAS DE LIGNOCELULOSE

A biorrefinaria pode integrar a obtenção de biocombustíveis, produtos químicos para vários setores, energia elétrica e calor em um mesmo espaço físico, sendo considerada uma abordagem promissora para criação de indústrias baseadas em matérias-primas renováveis (DEMIRBAS, 2009). A Figura 2 exemplifica as etapas de conversão em uma biorrefinaria de

lignocelulose, em que os açúcares obtidos podem ser convertidos em diversos produtos ou insumos, pelo uso de diferentes tecnologias (BRETHAUER & STUDER, 2015).

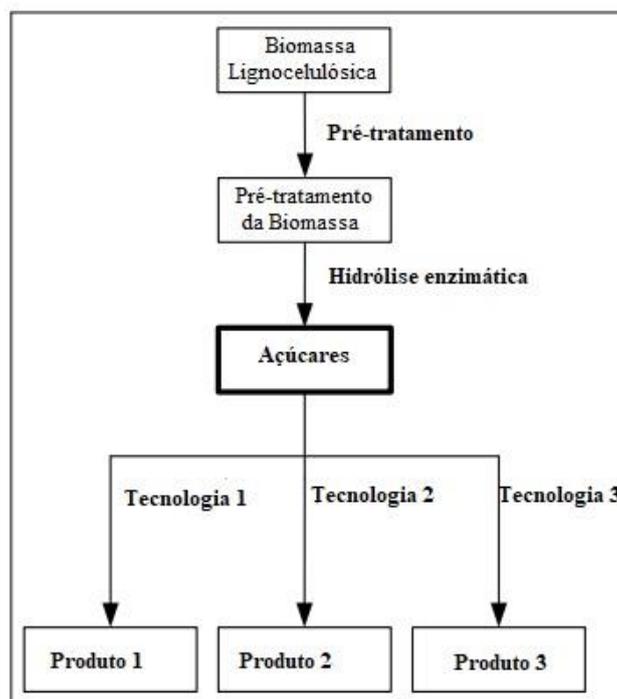


Figura 2. Representação simplificada de uma biorrefinaria de lignocelulose, focada na plataforma de açúcares. O açúcar é gerado a partir da biomassa submetida à etapas de pré-tratamento e de hidrólise enzimática. Os açúcares obtidos podem ser convertidos em diversos produtos ou insumos, pelo uso de diferentes tecnologias (Adaptado de BRETHAUER & STUDER, 2015).

A biomassa lignocelulósica é essencialmente composta de carbono capturado da atmosfera pelas plantas durante o seu crescimento, por meio da fotossíntese, convertendo a radiação solar em energia química armazenada como açúcares (p. ex.: amido, sacarose, glicose) e lignocelulose (CGEE, 2017).

Os produtos químicos provenientes de fontes renováveis representam apenas uma pequena fração da produção da indústria química, principalmente devido aos custos dos processos de produção (FIORENTINO et al., 2017). Estima-se que a participação dos produtos químicos provenientes de fontes renováveis cresça globalmente e que em 2050, pelo menos 30% dos produtos químicos serão derivados de biomassa renovável, substituindo assim uma quantidade considerável de recursos fósseis (SANDERS et al., 2012; FIORENTINO et al., 2017).

Da mesma forma, de acordo com a *International Energy Agency* (IEA) atualmente a bioenergia (proveniente de biomassa) é responsável por 10% do fornecimento global de energia primária. Com relação aos biocombustíveis (p. ex. bioetanol e biodiesel), espera-se que sua utilização como combustíveis de transporte cresça de 2% da participação de

mercado atual para até 27% em 2050 (FIORENTINO et al., 2017).

A busca por alternativas sustentáveis em relação ao petróleo tem como foco a utilização de biomassa lignocelulósica não alimentar (resíduos agrícolas, de madeira, ou fração orgânica de resíduos sólidos municipais) para a produção de combustíveis líquidos, produtos químicos e biomateriais diversos através do desenvolvimento de biorrefinarias (JORGENSEN & PINELO, 2017). No cenário atual, atenção significativa tem sido dada às matérias-primas derivadas da agricultura. A qualidade e o custo das fontes de biomassa lignocelulósica podem variar amplamente, dependendo dos padrões climáticos, práticas agrônômicas, métodos de colheita e locais geográficos (CGEE, 2017).

No Brasil, a agroindústria da cana-de-açúcar é a principal fonte de biomassa lignocelulósica para uso em biorrefinarias. A cana-de-açúcar (complexo *Saccharum*) é uma espécie perene com talos altos, rica em açúcares e que cresce em regiões tropicais e subtropicais. As hastes colhidas (parte aérea) possuem aproximadamente 70% de água e a matéria seca é composta basicamente por sacarose e lignocelulose. A cana-de-açúcar é plantada uma vez e colhida repetidamente após 12 a 18 meses de crescimento por 5 a 6 anos. Aproximadamente um terço da energia total da biomassa da parte aérea é referente à fração de açúcares presente no caule (sacarose), enquanto outro terço da energia total está presente no bagaço, e o último terço corresponde à palha deixada no campo após a colheita mecânica. As duas últimas frações são essencialmente materiais lignocelulósicos (CGEE, 2017).

De modo geral são reconhecidas duas rotas principais para conversão dos componentes da biomassa em compostos químicos e biocombustíveis: rotas bioquímica e termoquímica (CGEE, 2010). A rota bioquímica tem recebido maior destaque nos últimos anos, o que é exemplificado pela entrada em operação das primeiras biorrefinarias baseadas na conversão bioquímica de biomassa lignocelulósica em bioetanol em diferentes países e também no Brasil. Como exemplos, podem ser citadas as empresas Abengoa, POET-DSM, Dupont, DONG Energy, Beta Renewables, Ineos Bio, LONGLIVE, Clariant, Axens, GranBio e Raízen (SILVA & FERREIRA FILHO, 2017; NOVY et al., 2019).

No entanto, conforme relatado nos trabalhos de Jong et al. (2012) e de Jørgensen & Pinelo (2017), a situação ideal seria que as biorefinarias produtoras de bioetanol diversificassem ainda mais os seus produtos. De acordo com os autores, a produção de produtos químicos de maior valor agregado juntamente com o bioetanol tem atraído muita atenção de modo a tornar a biorrefinaria de lignocelulose competitiva em comparação aos processos que utilizam recursos fósseis ou que utilizam sacarose (açúcares de primeira geração) e outros açúcares derivados de culturas amiláceas.

2.2. ESTRUTURA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica consiste principalmente de celulose, hemicelulose, lignina e pequenas quantidades de pectina, proteínas e extrativos (JORGENSEN et al., 2007). A composição é dependente da origem botânica, das partes da planta, da idade e das condições de crescimento. As diferenças são evidentes entre diferentes tipos de madeira (gimnospermas, angiospermas) ou gramíneas (*Poaceae*) e tais diferenças estão relacionadas principalmente à estrutura e à composição das hemiceluloses e da lignina (JORGENSEN & PINELO, 2017). A Figura 3 representa um esquema da parede celular vegetal, com ênfase na estrutura de uma microfibrila composta por várias moléculas de celulose depositadas uma sobre as outras, mostrando as unidades de glicose ligadas entre si por ligações do tipo beta-1,4, além de uma das moléculas de hemicelulose comumente encontradas na parede celular da cana-de-açúcar (o glucoarabinoxilano) (BUCKERIDGE et al., 2014).

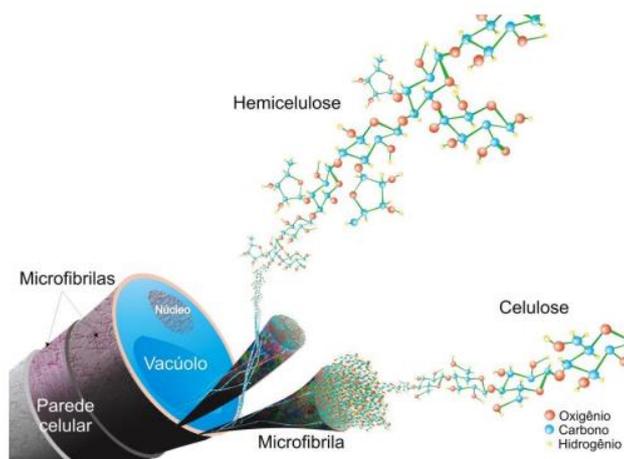


Figura 3. Representação esquemática da parede celular vegetal, mostrando seus principais constituintes. A figura ilustra a célula vegetal em corte transversal sendo possível evidenciar o núcleo e vacúolo. Na parede celular vegetal é possível observar a estrutura de uma microfibrila de celulose composta por várias moléculas de celulose. Uma das moléculas de celulose se apresenta aumentada e prolongada, mostrando as unidades de glicose ligadas entre si por ligações do tipo beta-1,4. Uma das moléculas componentes da hemicelulose (glucoarabinoxilano) também é mostrada em detalhe na parte superior da figura. Fonte: BUCKERIDGE et al. (2014).

A celulose é o principal polissacarídeo da parede celular vegetal. É formada por moléculas de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas. A unidade estrutural mínima da celulose é denominada celobiose, enquanto a glicose representa a unidade fundamental das cadeias do polímero (HORN et al., 2012). É formada por ligações de hidrogênio inter e intracadeias, altamente coesivas e possui uma estrutura rígida (VOET et al., 1999). Essas características fazem com que seja inacessível às enzimas celulolíticas.

As hemiceluloses apresentam heterogeneidade e são formadas por polissacarídeos ramificados formados principalmente por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose, ramnose e galactose) e ácidos urônicos (RAMOS, 2003). Geralmente é formada por 2 a 6 diferentes monômeros, estes unidos, na maioria das vezes, por ligações do tipo β -1,4, podendo também ocorrer ligações β -1,3 glicosídicas (RODRIGUES et al., 2013). A natureza química da hemicelulose varia entre os tecidos vegetais, estágio de desenvolvimento e entre espécies vegetais. Geralmente são classificadas conforme o açúcar majoritário na cadeia principal e nas ramificações. Por exemplo, os quatro principais tipos de hemicelulose são as xilanas, xiloglicanas, glicanas, e mananas, como as glicomananas, galactomananas e galactoglicomananas (RODRIGUES et al., 2013).

A estrutura química da lignina é complexa e é baseada nos três precursores monoméricos, cujas proporções podem variar dependendo da espécie de planta: *p*-hidroxibenzil (derivado do álcool *p*-coumarílico), guaiacila (derivado de álcool coníferílico) e siringuila (derivado de álcool sinapílico) (RODRIGUES et al., 2013). Os resíduos são unidos por diferentes tipos de ligações, como éster, éter, C-C, sendo mais abundante a ligação do tipo β -O-4, que corresponde a 45-60% das ligações (RODRIGUES et al., 2013).

A lignina atua como material adesivo e enrijecedor impedindo a degradação enzimática da parede celular (FELDMAN, 1985). As ligações covalentes entre os polissacarídeos da parede celular ocorrem quase em sua totalidade entre lignina e hemicelulose, porém há indícios de que, em menor grau, existam ligações covalentes entre lignina e celulose (FELDMAN, 1985). Neste contexto, a cristalinidade da celulose, a proteção da hemicelulose e o suporte da lignina proporcionam baixa acessibilidade e contribuem para a resistência da biomassa à hidrólise enzimática (MOSIER et al., 2005).

2.3. DESCONSTRUÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

2.3.1. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Devido à natureza recalcitrante dos componentes da lignocelulose, em especial da celulose, é necessária uma etapa de pré-tratamento para melhorar a eficiência da hidrólise enzimática (HIMMEL et al., 2007). Diferentes processos de pré-tratamento são conhecidos e um aspecto comum a todos é que eles reorganizam e removem partes dos componentes da parede celular vegetal (Figura 4), tornando a biomassa mais acessível para a degradação enzimática por celulasas e outras enzimas (YANG & WYMAN, 2008; ZHANG, 2008). Diversos pré-tratamentos vêm sendo estudados para viabilizar a utilização da biomassa

lignocelulósica para diferentes finalidades (ZHANG, 2008).

Os principais tipos de pré-tratamento são: físicos (fragmentação ou moagem do material); físico-químicos (explosão à vapor, com ou sem catalisador, autohidrólise e organosolv); químicos (hidrólise ácida; ozonólise ou deslignificação oxidativa) e biológicos (microbianos ou enzimáticos) (CGEE, 2010).

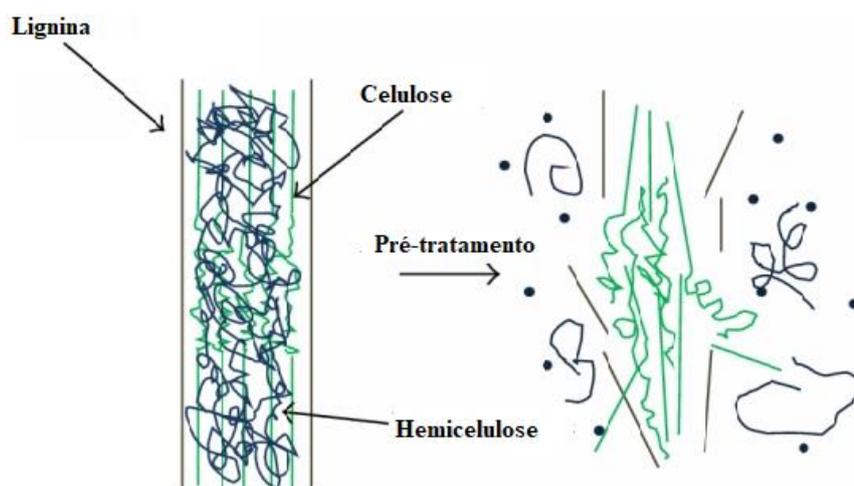


Figura 4. Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos. Fonte: LEE et al. (2014).

As técnicas de pré-tratamento envolvem um sinergismo entre a ação do calor, do pH do meio e do tempo de exposição da matriz nas condições do processo, levando à diminuição da cristalinidade da molécula da celulose. Dada a heterogeneidade dos materiais lignocelulósicos, não se pode eleger um único processo de pré-tratamento como sendo o melhor. A escolha dependerá, basicamente, da natureza do material a ser tratado, bem como da finalidade do uso do hidrolisado (CGEE, 2010).

A eficiência dos pré-tratamentos é analisada principalmente a partir dos dados de rendimento de açúcares após a hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é limitada por fatores como a cristalinidade da celulose, a umidade e a área superficial (porosidade do material) (CHANG & HOLTZAPPLE, 2000). Estudos apontam como causas de resistência dos materiais lignocelulósicos à hidrólise enzimática a baixa acessibilidade das enzimas às fibras celulósicas, à presença de hemicelulose e, principalmente, de lignina, na superfície da celulose, que impedem a ação das celulases (ZHANG, 2008). A Tabela 1 resume as vantagens e desvantagens de algumas técnicas de pré-tratamento avaliadas para materiais lignocelulósicos.

Tabela 1. Sumário das vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (Fonte: WYMAN et al., 2005).

Pré-tratamento	Métodos	Vantagens	Desvantagens
Físico	Moagem ou vibração	Redução da cristalinidade Diminuição do tamanho da partícula (maior acessibilidade)	Não retira lignina Não é suficiente para aumentar a taxa de conversão de açúcar
Físico-químico	Hidrotérmico (ou autohidrólise)	Não utiliza reagentes químicos	Alto gasto energético
Fracionamento por solvente	Processo organosolv	Aumento da digestibilidade da biomassa celulósica; Solubiliza lignina e hemicelulose	Alto custo dos solventes orgânicos, bem como da sua recuperação
Químico	Explosão à vapor (com / sem adição de ácido como catalisador)	Altos rendimentos de glicose e açúcares de hemicelulose	Formação de produtos de degradação; Necessita de uma etapa adicional para a remoção da lignina
Pré-tratamento biológico	Uso de fungos ou bactérias	Remove quantidade considerável de lignina; Pré-tratamento brando (ótimo para materiais com alto conteúdo de carboidratos)	Maior tempo de residência; Bactérias/fungos consomem um pouco do carboidrato disponível – menor rendimento de açúcar

Outro fator importante no pré-tratamento é que a etapa de pré-processamento da biomassa seja de baixo custo, evitando o elevado consumo de reagentes químicos, o alto gasto energético e a intensa degradação dos materiais lignocelulósicos. A seguir são detalhados os pré-tratamentos hidrotérmico (autohidrólise) e organosolv, os quais foram utilizados no presente trabalho.

O pré-tratamento hidrotérmico tem chamado atenção por não fazer uso de reagentes químicos, que é interessante do ponto de vista ambiental e econômico, não havendo a necessidade de trabalhar com reatores altamente resistentes à corrosão e por hidrolisar grande parte da fração hemicelulósica (SANTOS et al., 2014). Esse tratamento é indicado ao setor de biorrefinaria, pois é capaz de reduzir o tamanho das partículas lignocelulósicas, maximizar a recuperação de celulose e obter um substrato susceptível à hidrólise enzimática. Vários estudos foram realizados utilizando esse método de pré-tratamento em diferentes biomassas, tais como a palha de trigo, palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, o gasto energético para atingir e manter a temperatura durante o tempo reacional foi a principal desvantagem (SANTOS et al., 2014; SILVA, 2018).

Nas últimas décadas houve um grande interesse na investigação do uso de água quente, sob elevada pressão, em processos de conversão de biomassa com o interesse de melhorar a hidrólise enzimática. Esse método é promissor, dentre os diversos pré-tratamentos de lignocelulose (YU et al., 2008). O processo hidrotérmico, ou autohidrólise, utiliza somente água como insumo para conseguir o fracionamento parcial da biomassa por meio da aplicação de temperatura e pressões altas, ocasionando a quebra da hemicelulose presente na estrutura lignocelulósica e promovendo uma desestruturação da lignina, permitindo assim maior acesso à celulose (RUIZ et al., 2013; SILVA, 2018; HU & RAGAUSKAS, 2012).

Além do tratamento hidrotérmico (autohidrólise), o outro método escolhido para uso no presente trabalho foi o tratamento organosolv, que é capaz de extrair a lignina da matéria-prima lignocelulósica com solventes orgânicos (p. ex.: metanol, etanol, glicerol, etilenoglicol e trietilenoglicol, ácidos orgânicos, acetona, dioxano, fenol, entre outros). O principal alvo desse tratamento é a remoção da lignina para disponibilizar um resíduo celulósico com maior digestibilidade enzimática (ZHAO & LIU, 2009). Sua vantagem é a possibilidade de, por meio da modulação dos solventes e das condições operacionais, conseguir um tratamento mais seletivo para o fracionamento da biomassa nos seus componentes estruturais. Na biorrefinaria, permite o uso de todos os componentes da biomassa lignocelulósica e é considerado como uma das mais promissoras estratégias de pré-tratamento para a melhoria da sacarificação enzimática de lignocelulose (ZHAO et al., 2009).

O pré-tratamento organosolv elimina a lignina de materiais lignocelulósicos, mas a maioria dos açúcares hemicelulósicos também é solubilizada por esse processo (MESA et al., 2011). Ele é capaz de produzir grande quantidade de uma lignina de alta qualidade relativamente pura, principalmente inalterada, e menos condensada que as ligninas Kraft (MESA et al., 2011).

No entanto, existem desvantagens inerentes ao pré-tratamento organosolv, pois os sólidos pré-tratados precisam ser lavados com uma mistura de água e solvente (uma vez que a lignina é insolúvel em água), a fim de evitar a reprecipitação de lignina dissolvida; isso causa o aumento do consumo de energia (ZHAO et al., 2009). Ademais, o pré-tratamento organosolv deve ser realizado sob controle extremamente rigoroso e eficiente devido à volatilidade dos solventes. Nenhum vazamento do digestor pode ser tolerado por causa do perigo inerente de incêndio e explosão (AZIZ & SARKANEN, 1989).

2.3.2. Principais enzimas e seu modo de ação na desconstrução de biomassa lignocelulósica

Dependendo dos tipos de biomassa e métodos de pré-tratamento, a composição do material pré-tratado e suas propriedades químicas e físicas variam significativamente (KIM et al., 2015). Nesse aspecto, misturas enzimáticas específicas para a biomassa alvo (customizadas) têm sido empregadas para a hidrólise eficiente da biomassa e essa estratégia tem sido utilizada por diferentes biorrefinarias de lignocelulose (ROSGAARD et al., 2007; JORGENSEN & PINELO, 2017; NOVY et al., 2019)

As enzimas envolvidas na desconstrução de polissacarídeos e lignina são classificadas em diferentes famílias: glicosil hidrolases (GH), que são enzimas que clivam as ligações glicosídicas por meio de hidrólise; polissacarídeo liases (PL), enzimas que clivam ligações glicosídicas por meio de reações de β -eliminação; carboidrato esterases (CE) relacionadas às enzimas que degradam ligações éster envolvendo carboidratos; oxidases da lignina, entre outras, baseadas na comparação de sequências de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismos catalíticos, conforme a base de dados *Carbohydrate Active Enzymes (CAZY)* (CANTAREL et al., 2009; LOMBARD et al., 2014).

É amplamente reconhecido que são necessários três tipos de glicosil hidrolases para a hidrólise da celulose: endoglicanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases (BG) (SWEENEY & XU, 2012). Por atuarem de forma diferente sobre a estrutura da celulose, observa-se um efeito sinérgico entre elas. Também é atualmente conhecido que a degradação da celulose não envolve somente um processo hidrolítico; diversos microrganismos, especialmente fungos e bactérias, produzem enzimas oxidativas, tais como os mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), as quais clivam a celulose por um mecanismo oxidativo (dependente de elétrons), conforme será detalhado adiante nessa revisão.

A bioconversão da celulose a açúcares solúveis geralmente é catalisada por uma mistura multi enzimática (coquetel), envolvendo a ação sinérgica de enzimas como celulasas e β -glicosidases (DELABONA et al., 2012). A degradação ocorre com uma ação sequencial e cooperativa entre essas enzimas na qual o produto de uma se torna o substrato da seguinte (HORN et al., 2012; SWEENEY & XU, 2012; KUBICEK & KUBICEK, 2016), conforme ilustrado na Figura 5, a qual também ilustra o papel das LPMOs na clivagem da celulose, bem como das expansinas, detalhadas mais adiante nessa revisão.

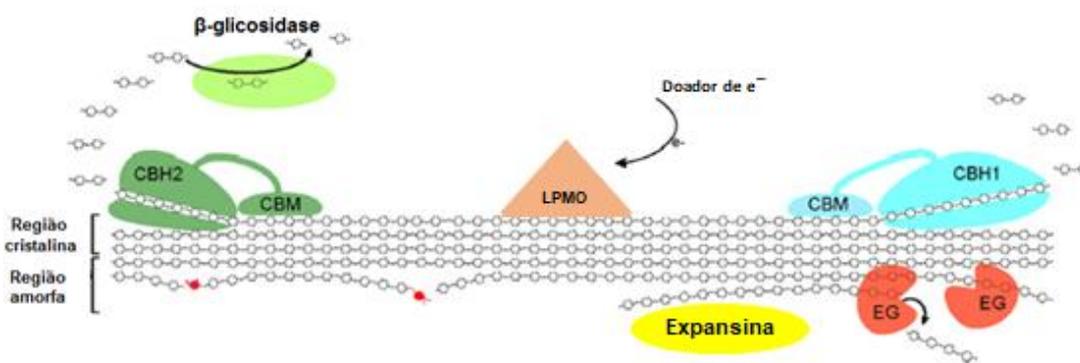


Figura 5. Principais enzimas que atuam na clivagem da celulose. EG: Endoglicanases agindo de forma aleatória na região amorfa da celulose, liberando terminais redutores e não redutores para o processamento das exoglicanases. CBM: Módulo de ligação a carboidrato, o qual reconhece e promove a ligação das CBHs ao substrato. CBH1: Exoglicanase atuando na extremidade redutora da celulose. CBH2: Exoglicanase atuando na extremidade não-redutora, ambas liberando celobiose. β -glicosidase: enzima que converte a celobiose em monômeros de glicose. LPMO: Mono-oxigenase lítica de polissacarídeo promovendo a oxidação da porção cristalina da celulose no carbono C1 e C4, respectivamente, liberando terminais redutores e não redutores para posterior atuação das exoglicanases. Expansinas: Rompem as ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos da parede celular sem atividade hidrolítica, afrouxando-a. Fonte: HORN et al. (2012).

As endoglicanases (EGs) são responsáveis por reduzir o grau de polimerização da celulose gerando novas extremidades redutoras e não redutoras suscetíveis à posterior ação das exoglicanases (CBH). A atuação conjunta das endo e exoglicanases é a primeira forma de sinergia existente no processo de hidrólise da celulose. As β -glicosidases têm como papel completar a degradação da molécula de celulose à glicose, promovendo a conversão da celobiose e de oligossacarídeos solúveis em água. A maioria das celulasas (CBH e EG) possui uma estrutura de dois domínios que consiste em um módulo de ligação a carboidrato (CBM) não catalítico e um domínio catalítico. A adsorção e a orientação correta das celulasas na superfície da celulose são mediadas pelo módulo CBM (PAYNE et al., 2015).

De modo semelhante à degradação da celulose, a despolimerização da hemicelulose também requer a ação sinérgica de diferentes enzimas. As hemicelulasas representam um grande número de atividades enzimáticas diferentes (xilanases, mananases, arabinofuranosídeses, etc.) (SHALLOM & SHOHAM, 2003). Por exemplo, para a completa degradação de xilana é necessária a atuação de endo-1,4- β -xilânase e também α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosídease, acetil-xilana-esterase e β -xilosídease. Para a degradação de galactoglicomanana são requeridas endo-1,4- β -glicanases, endo-1,4- β -mananases, α -galactosídeses, acetil-manana-esterases, β -manosídeses e β -glicosídeses (YANG et al., 2011; VÁRNAI et al., 2014).

As enzimas que atuam nas ligações entre carboidratos e lignina também são

importantes para desconstrução da biomassa, como as feruloil esterases (FAEs) (ou esterases do ácido ferúlico) (VÁRNAI et al., 2014). As feruloil esterases catalisam a hidrólise de ligações do tipo éster entre o ácido ferúlico (ou hidroxicinâmico) e polissacarídeos da parede celular. Portanto, elas auxiliam as enzimas xilanolíticas e pectinolíticas a ter acesso ao seu local de ação durante a conversão da biomassa (DILOKPIMOL et al., 2016).

A seguir são apresentados de forma sucinta os modos de atuação de celulases, hemicelulases, pectinases, mono-oxigenases líticas de polissacarídeos, expansinas e expansinas-*like*.

2.3.2.1. Celulases

As celulases são enzimas pertencentes à família glicosil hidrolase (GH) e agem de forma sinérgica na despolimerização da celulose. A Figura 6 mostra um esquema da atuação das principais hidrolases envolvidas na degradação da estrutura da celulose (FARINAS, 2011). A seguir é apresentado o modo de ação dessas hidrolases (endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase).

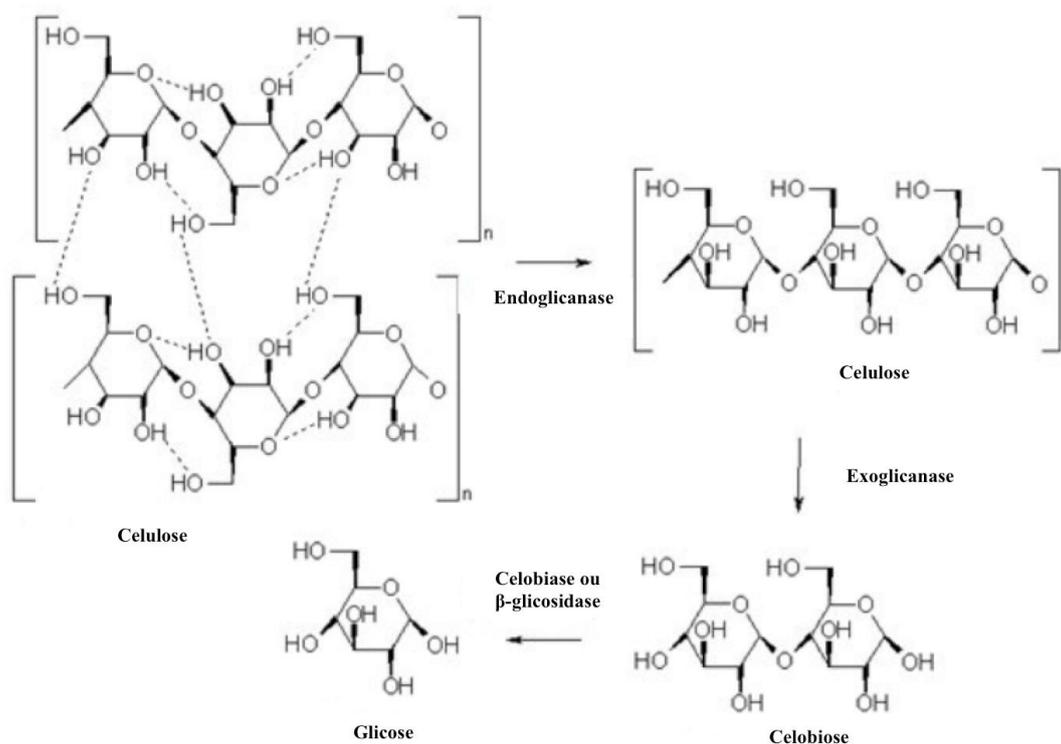


Figura 6. Sinergismo entre endoglicanases, exoglicanases e celobiases na despolimerização da estrutura da celulose. Fonte: FARINAS (2011).

a) As endoglicanases clivam ligações β -1,4-glicosídicas internas da estrutura da celulose, principalmente em regiões amorfas, liberando fragmentos (oligossacarídeos com diferentes números de glicose) que serão degradados pelas exoglicanases (OGEDA & PETRI,

2010; RODRIGUES et al., 2013).

b) As exoglicanases, tais como as celobiohidrolases, hidrolisam as ligações β -1,4-glicosídicas terminais das regiões cristalinas da celulose liberando dissacarídeos (celobioses) e monômeros de glicose solúveis. Atuam nas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias de celulose de maneira processual e continuam a hidrolisar a mesma durante vários ciclos (RODRIGUES et al., 2013).

c) As β -glicosidases (ou celobiasas) hidrolisam a celobiose liberada pelas endoglicanases e exoglicanases, promovendo a conversão da celobiose em glicose. Também podem catalisar a hidrólise de oligossacarídeos em glicose (RODRIGUES et al., 2013).

2.3.2.2. Hemiceluloses

Alguns tipos de hemiceluloses possuem a xilana como principal polissacarídeo, entre outros polímeros heterogêneos (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002). As pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose) são os principais componentes das hemiceluloses (Figura 7) e sua composição é variável dependendo da origem do material vegetal (BRANDT et al., 2013).

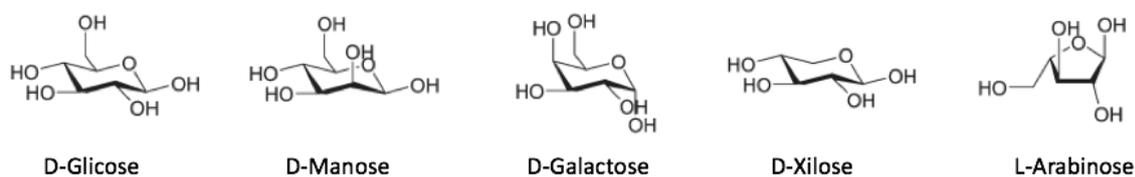


Figura 7. Principais açúcares componentes da estrutura heterogênea das hemiceluloses. Fonte: BRANDT et al. (2013).

A estrutura da hemicelulose é complexa, com diferentes tipos de açúcares, ligações glicosídicas e substituintes laterais, o que requer a ação coordenada de diversas enzimas para sua degradação, incluindo endo-1,4- β -D-xilanases, β -D-xilosidases, α -arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil-xilana-esterase e feruloil-esterases (DODD & CANN, 2009).

As mananases são carboidrases responsáveis por degradar cadeias de mananas da hemicelulose. Elas hidrolisam a ligação β -1,4 da cadeia principal dos polissacarídeos de β -D-manose (mananas). A hidrólise da cadeia principal fica a cargo das endo-mananases, que liberam oligômeros que são substratos para as β -manosidases (MOREIRA & FERREIRA FILHO, 2008). Enzimas adicionais como a β -glicosidase e α -galactosidase são requeridas

para remover açúcares das cadeias ramificadas que constituem os galactoglicomananos e os arabinogalactanos.

As α -L-arabinofuranosidases catalisam a hidrólise das ligações α -2, 3 e 5 de α -L-arabinofuranosil terminal não redutor e atuam em oligômeros e polímeros. Já as α -D-glucuronidases são enzimas que hidrolisam as ligações α -1,2 entre os resíduos do ácido 4-O-metil-D-glucurônico e as unidades de β -D-xilopiranosil existentes nos glucuroxilanos. Esterases tais como a acetil-xilano-esterase fazem parte de um complexo de enzimas que hidrolisam a ligação éster das hemiceluloses (SHALLOM & SHOHAM, 2003).

2.3.2.3. Pectinases

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes no material vegetal, por meio de reações de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases) (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005). A denominação enzimas pectinolíticas usualmente refere-se a enzimas que catalisam a degradação das moléculas constituídas por unidades de ácidos galacturônicos.

A pectina é um heteropolissacarídeo com ácido galacturônico e metanol como componentes principais. O polissacarídeo péctico consiste em um conjunto de polímeros, tais como o ácido poligalacturônico, arabana e galactana. Além do ácido D-galacturônico, açúcares tais como ramnose, arabinose, galactose, xilose e frutose também estão presentes (JAYANI et al., 2005).

As pectinases podem ser classificadas em três tipos com base em seu modo de ação: pectina esterase, hidrolases e liases. A pectina esterase catalisa a desesterificação do grupo metoxila da pectina, formando ácido péctico. Hidrolases (poligalacturonases e polimetilgalacturonases) catalisam a clivagem hidrolítica da ligação α -1,4-glicosídica do ácido péctico e da pectina, respectivamente; enquanto as liases (poligalacturonato liase e polimetilgalacturonato liase) catalisam a clivagem do α -1,4-glicosídeo em ácido péctico e pectina, respectivamente por reação de eliminação trans e formação de galacturonatos insaturados e metil galacturonatos, respectivamente (SILVA et al., 1997; GARG et al., 2016).

2.3.2.4. Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs)

O conceito de que a degradação de polissacarídeos é um processo hidrolítico foi revolucionado nos últimos anos devido à descoberta em fungos das mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) (KUBICEK & KUBICEK, 2016). Estas oxidases realizam clivagem oxidativa de celulose, hemicelulose, amido e quitina (HORN et al., 2012; AGGER

et al., 2014; BEESON et al., 2015; LEGGIO et al., 2015). Atualmente, a degradação desses polissacarídeos é considerada um processo hidrolítico e oxidativo.

As LPMOs auxiliam na redução da recalcitrância dos polissacarídeos (HORN et al., 2012) e permitem maior eficiência na degradação destes durante a sacarificação enzimática (PIERCE et al., 2017). O mecanismo de ação das LPMOs envolve clivagens oxidativas dependentes de doadores de elétrons (doadores enzimáticos ou não enzimáticos, sendo que componentes da própria lignina podem atuar como doadores de elétrons) (HU et al., 2015; FROMMHAGEN et al., 2016), de oxigênio molecular e/ou peróxido de hidrogênio (BISSARO et al., 2017) e de íons cúpricos (FRANDSEN & LO LEGGIO, 2016).

De acordo com a base de dados CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes Database*) (LOMBARD et al., 2014), as LPMOs são classificadas em diferentes famílias. Por exemplo, a família AA9 (*Auxiliary Activity 9*) inclui LPMOs exclusivamente de fungos com ação oxidativa sobre a celulose. A família AA10 inclui LPMOs principalmente de origem bacteriana, as quais podem clivar celulose ou quitina. Já a família AA11 inclui LPMOs de origem fúngica com ação sobre quitina, enquanto a família AA13 inclui LPMOs de fungos capazes de clivar amido de forma oxidativa (LO LEGGIO et al., 2015).

As LPMOs apresentam efeito sinérgico às hidrolases durante a hidrólise de substratos celulósicos, hemicelulósicos e amiláceos (AGGER et al., 2014; LO LEGGIO et al., 2015). De fato, alguns coquetéis enzimáticos comerciais possuem LPMOs da família AA9 em sua composição (KUBICEK & KUBICEK, 2016).

Apesar da aplicação biotecnológica, somente um pequeno número de LPMOs (bacterianas e fúngicas) tem sido caracterizado (HEMSWORTH et al., 2015). Neste aspecto, o estudo de novas LPMOs microbianas, sejam elas provenientes de bancos de dados, de espécies microbianas cultiváveis ou de microrganismos não cultiváveis (abordagem metagenômica), pode permitir o desenvolvimento de misturas enzimáticas mais eficientes para hidrólise de determinada biomassa de interesse. Paralelamente, sua utilização como aditivo durante a sacarificação de biomassa permite uma diminuição da quantidade de enzimas hidrolíticas necessárias para sacarificação, reduzindo os custos do processo de desconstrução de biomassa (MERINO & CHERRY, 2007; KUBICEK & KUBICEK, 2016).

As aplicações biotecnológicas das LPMOs vão além das biorrefinarias, pois têm potencial para serem utilizadas na indústria de rações, papel, têxtil, na produção de nanofibras de celulose, na indústria de alimentos funcionais, entre outros bioprodutos.

2.3.2.5. Expansinas e expansinas-like

Entre as proteínas que auxiliam a desconstrução de polissacarídeos constituintes da biomassa lignocelulósica, as expansinas e as expansinas-like têm recebido atenção especial. As expansinas são proteínas não hidrolíticas encontradas na parede celular das plantas e também ocorrem em outros organismos, como bactérias, fungos, nematóides, amebas, moluscos e vírus, sendo denominadas expansinas-like (FAVARO & POLETTI, 2013; COSGROVE, 2017). Nas plantas, as expansinas estão envolvidas em diferentes respostas fisiológicas e ambientais, como crescimento de folhas e caule, abertura e fechamento de estômatos, reprodução, amadurecimento e tolerância a estresses (SANTIAGO et al., 2018). Elas rompem as ligações não covalentes entre as microfibrilas de celulose e os demais polímeros da matriz por um mecanismo não enzimático, levando ao afrouxamento e extensão da parede celular (SAMPEDRO & COSGROVE, 2005). Devido às suas características, elas têm sido estudadas para diferentes aplicações, tais como na desconstrução de biomassas lignocelulósicas, e em outras aplicações que demandam alterações nas propriedades químicas e físicas da celulose.

As expansinas contêm de 250 a 275 aminoácidos e possuem dois domínios antecidos por um peptídeo sinal (Figura 8). O domínio 1 tem homologia distante com proteínas da família glicosil hidrolase 45 (GH45). Ele é localizado na região N-terminal da proteína e possui estrutura do tipo *double-psi beta-barrel* (DPBB). Esse domínio é acoplado à um domínio C-terminal (domínio 2) (Figura 8) homólogo aos alérgenos de pólen de gramíneas do grupo 2, que são de função biológica desconhecida (YENNAWAR et al., 2006; CROSGROVE, 2005).

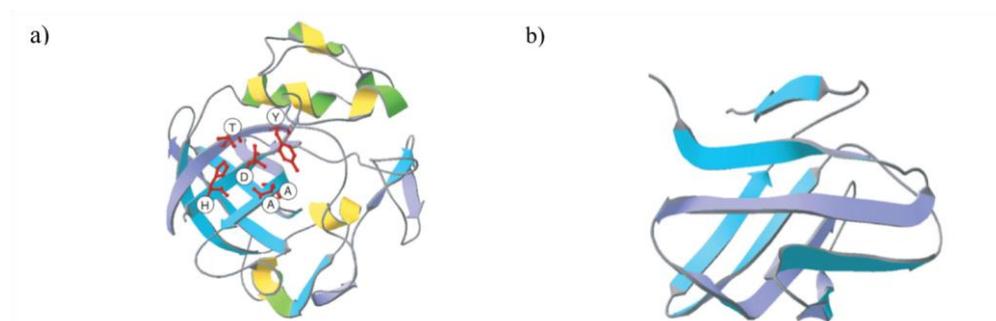


Figura 8. Estrutura de proteínas homólogas aos dois domínios das expansinas de plantas. (a) Domínio de Expansina 1 (a figura mostra o domínio catalítico de uma endoglicanase da família GH45 do fungo filamentoso ascomiceto *Humicola insolens*; com o domínio *double-psi beta-barrel* - DPBB; os resíduos de aminoácidos que são conservados em expansinas estão indicados no código de aminoácidos (letras). (b) Domínio de Expansina 2 (a figura mostra uma proteína G2A de *Phleum pratense*, a qual é um tipo de alérgeno de pólen de gramíneas do grupo 2). Fonte: SAMPEDRO & COSGROVE (2005).

As expansinas fazem parte de uma superfamília dividida em quatro subfamílias: α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), expansinas-like A (EXLA) e expansinas-like B (EXLB). As α -expansinas e β -expansinas são conhecidas por afrouxarem a estrutura da parede celular e por estarem envolvidas em outros eventos do desenvolvimento da planta (SAMPEDRO & COSGROVE, 2005; COSGROVE, 2017). A expressão das expansinas é diferencialmente regulada nas fases de desenvolvimento da planta por hormônios e também por fatores ambientais (CHO & COSGROVE, 2002; SANTIAGO et al., 2018).

O modelo de afrouxamento da parede celular pelas expansinas é exemplificado na Figura 9. Considera-se que a proteína tenha capacidade de perturbar as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose. O estresse resultante da ação da expansina resulta no deslocamento dos polímeros da parede e no deslizamento nos pontos de aderência (COSGROVE, 2000).

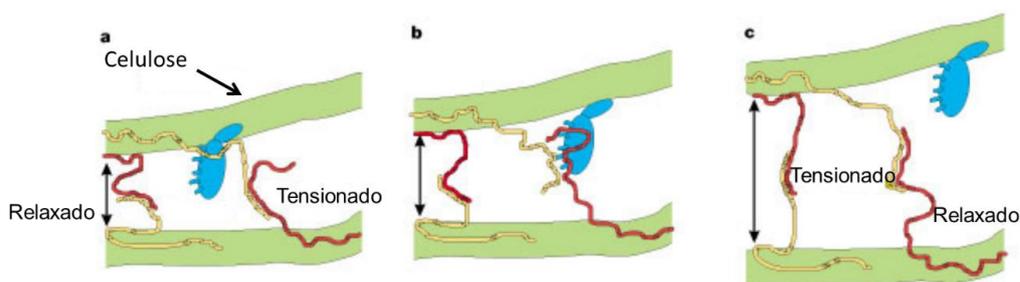


Figura 9. Esquema de afrouxamento da parede celular vegetal pela ação de expansinas (estrutura em cor azul nas figuras a, b e c). As microfibrilas de celulose são conectadas umas às outras por glicanos (fitas amarelas e vermelhas) que podem aderir na superfície da microfibrila e entre si. A hipótese é tal que a expansina (azul) pode perturbar a ligação dos glicanos à superfície da microfibrila (a) ou entre si (b). Sob o estresse mecânico resultante do turgor, a ação da expansina resulta em um deslocamento dos polímeros da parede (c) e desliza nos pontos de adesão do polímero (comparação entre a e c). Fonte: COSGROVE (2000).

Uma das principais barreiras encontradas pelas enzimas celulolíticas é o acesso limitado às moléculas de celulose que permanecem na porção interior das microfibrilas (ARANTES & SADDLER, 2010). Nesse aspecto, tem sido proposto que o afrouxamento de microfibrilas de celulose pela ação de proteínas não hidrolíticas, tais como as expansinas, pode facilitar o acesso das enzimas às fibras, aumentando a área disponível e tornando a sacarificação enzimática mais eficiente (BAKER et al., 2000).

Apesar de alguns esforços para caracterização bioquímica de expansinas de plantas, o número de expansinas-like microbianas caracterizadas e descritas como envolvidas no afrouxamento de celulose é maior do que as de origem vegetal (MARTINEZ-ANAYA, 2016). Algumas expansinas de plantas que aumentam a eficiência da hidrólise de celulose são

provenientes de pepino (Ex29 / Ex30), de milho (EXPB1) e de tomate (*LeEXP2*) (BAKER et al., 2000; LIU et al., 2014).

A escassez de estudos funcionais sobre expansinas de plantas se deve em parte à dificuldade de extração dessas proteínas a partir de tecidos vegetais e também à dificuldade de produzi-las em hospedeiros heterólogos na sua forma funcional e em quantidade suficiente para caracterização bioquímica e outras aplicações (LIU et al., 2015; COSGROVE, 2017).

Entre as poucas expansinas-*like* de origem microbiana caracterizadas até o momento, as mais estudadas são *BsEXLX1* da bactéria *Bacillus subtilis* e swollenin (SWO) do fungo *Trichoderma reesei*, conforme as revisões de MARTINEZ-ANAYA (2016), de COSGROVE (2017) e de GEORGELIS et al. (2015). De fato, o foco da maioria dos estudos sobre expansinas de plantas e expansinas-*like* microbianas tem sido voltado para seu uso como um aditivo na sacarificação enzimática da celulose. Entretanto, essas proteínas têm potencial para uso em diferentes processos onde o afrouxamento de microfibrilas de celulose ou modificações das propriedades físicas e químicas da celulose sejam necessárias: **i)** Indústria de papel: para obtenção de polpa de celulose (PERE et al., 2006); para reciclagem de papel (LIAN-CHAO & COSGROVE, 2004); para modificar as fibras da polpa e aumentar a taxa de absorção de água de folhas de papel fabricadas com a polpa tratada com expansinas (MA & TAUSCHE, 2013); **ii)** Indústria têxtil: para impregnação de corantes nas fibras (COSGROVE; TAKEDA, 2007); para fabricação, tratamento e acabamento de têxteis à base de celulose (BERENDES et al., 2001); **iii)** Indústria de alimentos e rações animais: tecnologia para aumentar o desempenho de utilização das fibras ou a fermentação ruminal (LI et al., 2019; ADESOGAN et al., 2019).

Assim, para explorar todo o potencial das expansinas e das expansinas-*like* em biorrefinarias de lignocelulose, é fundamental que meios e métodos que viabilizem a produção recombinante dessas proteínas sejam desenvolvidos.

2.4. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE EXPANSINAS E DE EXPANSINAS-LIKE POR *Pichia pastoris*

Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, diferentes sistemas de expressão têm sido estudados para produção de proteínas recombinantes (GOMES et al., 2016). A levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, reclassificada como *Komagataella phaffii* (KURTZMAN, 2009), tornou-se alvo de pesquisas e experimentos na biotecnologia, especialmente para a produção de proteínas heterólogas. Ela é considerada um das poucas espécies de leveduras capazes de utilizar o metanol como única fonte de carbono (CREGG et al., 1989; GELLISSEN, 2000; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Esse sistema de expressão tem sido utilizado com sucesso por mais de 20 anos para produção de proteínas recombinantes para vários usos, como produção de enzimas industriais e biofármacos. As principais vantagens em se utilizar esta levedura no setor industrial se deve à fácil manipulação, secreção de proteínas, disponibilidade de promotores regulados, potencial de atingir altas densidades celulares em diferentes fontes de carbono, entre outras (CANKORUR-CETINKAYA et al., 2018). Sendo um eucarioto, é capaz de realizar muitas modificações pós-traducionais realizadas por células eucarióticas e as proteínas recombinantes obtidas sofrem dobramento protéico, ligações dissulfeto e glicosilação (CANKORUR-CETINKAYA et al., 2018).

O sucesso da produção de proteínas recombinantes por *P. pastoris* depende de muitos fatores, como a escolha do vetor de expressão, da cepa de levedura, sinal de secreção, otimização de códons, a presença de um *tag* (cauda) de afinidade, o processamento correto da região N-terminal, número de cópias integradas e condições de crescimento. Por causa desses fatores, cada proteína precisa de otimização de suas próprias condições de expressão (DAMASCENO et al., 2012; AHMAD et al., 2014).

A revisão da literatura revelou que *P. pastoris* pode ser considerada um sistema versátil de expressão de expansinas-*like* de origem microbiana (WANG et al., 2014; TOVAR-HERRERA et al., 2015; QUARANTIN et al., 2019), especialmente porque as proteínas foram secretadas no meio extracelular, o que permitiu uma recuperação eficiente. Até o momento da realização deste trabalho, a única expansina de planta produzida por *P. pastoris* foi a α -expansina de tomateiro *LeEXP2* (MA et al., 2011; LIU et al., 2014); dessa forma é possível expressar novas expansinas de origem vegetal usando esse sistema. A Tabela 2 mostra alguns exemplos de produção recombinante de expansinas de plantas e de expansinas-*like* de microrganismos por diferentes hospedeiros, incluindo *P. pastoris*.

Tabela 2. Produção recombinante e caracterização funcional de expansinas provenientes de plantas* e de expansinas-*like* de fungos** e de bactérias*** de diferentes espécies.

Origem	Expansina / Expansina- <i>like</i>	Hospedeiro	Vetor de expressão	Referências
<i>Cucumis sativus</i> *	CsEXPA1	<i>Z. mays</i>	Não inf.	Sampedro et al., 2015
<i>Lycopersicon esculentum</i> *	<i>LeEXP2</i>	<i>P. pastoris</i> X-33	pPICZ α A	Liu et al., 2014
<i>Oryza sativa</i> *	<i>OsEXP</i>	<i>E. coli</i> BL21	pET28	Seki et al., 2015
<i>Triticum aestivum</i> *	<i>TaEXPA2</i>	<i>Arabidopsis</i>	Atexpa2	Ren et al., 2018
<i>Zea mays</i> *	EXPB1	<i>P. pastoris</i> X-33	Não inf.	Yennawar et al., 2006
<i>Penicillium oxalicum</i> **	Poswo1	<i>T. reesei</i> Rut-C30	pAN7-1	Kang et al., 2013
<i>Schizophyllum commune</i> **	ScExlx1	<i>P. pastoris</i> X-33	pPICZ α A	Tovar-Herrera et al., 2015
<i>Trichoderma harzianum</i> **	ThSWO	<i>E. coli</i> Rosetta	pET28a	Santos et al., 2017

<i>Trichoderma reesei</i> **	TrSwo1	<i>P. pastoris</i> X-33	pPICZ α A	Wang et al., 2014
<i>Bacillus subtilis</i> ***	BsEXLX1	<i>E. coli</i>	pET21a	Kim et al., 2009
<i>Bacillus subtilis</i> ***	BsEXLX1	<i>P. pastoris</i> X-33	pPICZ α A	Wang et al., 2014
<i>Clostridium clariflavum</i> **	CcEXL1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a	Artzi et al., 2016
<i>Hahella chejuensis</i> ***	HcEXLX2	<i>E. coli</i> BL21	pET21a	Lee et al., 2010

2.5. PRODUÇÃO *ON-SITE* DE ENZIMAS POR FUNGOS UTILIZANDO BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PRÉ-TRATADA COMO FONTE DE NUTRIENTES

Embora o custo de produção das enzimas seja um dos principais obstáculos para desconstrução da lignocelulose, é bastante conhecido que há outros desafios tecnológicos da aplicação de enzimas na sacarificação de biomassas. Conforme relatado por FLORENCIO et al. (2017) o pré-tratamento é uma das etapas críticas da biorrefinaria de lignocelulose e a escolha do tipo de tecnologia e condições de processo irão impactar diretamente as etapas subsequentes. Outro desafio é o processamento de altas cargas de sólidos na etapa de hidrólise enzimática (KRISTENSEN et al., 2009), de modo a se obter a quantidade necessária de açúcares fermentescíveis que viabilize o processo. Também há o desafio de minimizar o efeito dos chamados inibidores da atividade enzimática (especialmente compostos fenólicos, ácidos orgânicos, entre outros) oriundos da lignina durante o pré-tratamento (CANTARELLA et al., 2004). Somando-se a isso, há o fenômeno conhecido como adsorção improdutivo das celulasas à lignina presente na biomassa pré-tratada (FLORENCIO et al., 2017) e a consequente diminuição da conversão de hidrólise.

Com relação às enzimas, a maioria das preparações enzimáticas comerciais para desconstrução de lignocelulose são produzidas por fungos. Isso se deve em parte à própria estratégia de vida desses organismos, os quais possuem nutrição heterotrófica: eles dependem da secreção de enzimas que atuam na desconstrução de moléculas complexas em compostos simples que são então utilizados como nutrientes (KUBICEK, 2012). O desenvolvimento de novas linhagens fúngicas (nativas ou recombinantes) produtoras de extratos enzimáticos eficientes para hidrólise de biomassa é uma estratégia que tem alcançado maior importância (SORENSEN et al., 2011; ELLILÄ et al., 2017), especialmente no cenário atual, onde a aplicação de enzimas desenvolvidas especificamente para determinada biomassa (customização) deixa de ser uma tendência e passa a ser uma necessidade das biorrefinarias.

A produção de enzimas *on-site*, ou seja, utilizando as mesmas instalações da biorrefinaria de lignocelulose, pode reduzir significativamente o custo das enzimas, proporcionando uma alternativa promissora para o crescimento do setor (SORENSEN et al., 2011; FLORENCIO et al., 2017). Estudos envolvendo análise técnico-econômica

compararam três estratégias de produção de celulases: *off-site*, *on-site* e integrada (na qual a fonte de carbono é a própria biomassa lignocelulósica) (JOHNSON, 2016). Verificou-se uma significativa redução de custos com a mudança do sistema *off-site* para *on-site* e integrado (JOHNSON, 2016). Especialmente devido à possibilidade de utilização de substratos de baixo custo provenientes da própria biorrefinaria (SORENSEN et al., 2011; ELLILÄ et al., 2017; FLORENCIO et al., 2017), ou mesmo da própria biomassa pré-tratada como fonte de nutrientes (JOHNSON, 2016; SILVA & FERREIRA FILHO, 2017; NOVY et al., 2019).

Alguns estudos mostram vantagens do uso de biomassa lignocelulósica pré-tratada como nutriente no meio de cultivo de fungos celulolíticos. Por exemplo, com relação ao bagaço de cana pré-tratado por explosão à vapor, DELABONA et al. (2012) mostraram que para algumas linhagens de *Trichoderma*, o uso do bagaço pré-tratado no meio de cultivo resultou na produção superior de FPase, xilanase e β -glicosidase comparado ao cultivo em sacarose, glicerol e lactose. Em outro caso, o extrato enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 cultivado em bagaço explodido à vapor mostrou capacidade de hidrólise semelhante ao extrato produzido com celulose, podendo a celulose ser então substituída pelo bagaço pré-tratado como substrato de baixo custo (CAMASSOLA & DILLON, 2012).

CUNHA et al. (2017) investigaram a produção de enzimas por *A. niger* A12 comparando bagaço *in natura* e explodido à vapor no meio de cultivo, considerando dois tipos de processo de produção. Os autores verificaram que independentemente do tipo de processo utilizado para o cultivo, a produção de xilanases e endoglicanases foi significativamente superior na presença do bagaço pré-tratado em relação ao não tratado.

A produção de enzimas por diferentes fungos cultivados em biomassa pré-tratada foi revisada por SILVA & FERREIRA FILHO (2017) e FLORENCIO et al. (2017). Estes autores concluíram que, embora existam variações, de modo geral parece existir uma tendência de que quando o cultivo é realizado com biomassa pré-tratada como fonte de carbono, o extrato enzimático secretado atua de modo mais eficiente na hidrólise da biomassa pré-tratada do que quando o cultivo é realizado em outras fontes (lactose, sofrorose, galactose, sacarose, celulose, entre outras), ou em biomassa *in natura* (não pré-tratada). Uma possível explicação está relacionada às diferentes composições dos extratos enzimáticos induzidos pela biomassa usada como substrato (CUNHA et al., 2017). Essa tendência foi observada por meio de análise comparativa das proteínas secretadas de fungos cultivados em diferentes fontes de carbono, utilizando técnicas de espectrometria de massas, conforme revisado por FLORENCIO et al. (2017) e mais recentemente por NOVY et al. (2019), em sua ampla revisão com foco no fungo celulolítico industrial *T. reesei*.

2.6. FUNGOS ENDOFÍTICOS

2.6.1. Características gerais

Diferentes microrganismos procarióticos e eucarióticos vivem em associação com as plantas e são parte integrante de seu microbioma. As plantas podem ser consideradas um microecossistema complexo com diferentes nichos, tais como as superfícies externas e internas, nas quais podem coexistir fungos, bactérias, arqueias e vírus (FÁVARO, 2009).

Existem algumas definições de microrganismos endofíticos, mas em geral eles são definidos como aqueles que podem ou não crescer em meio de cultura e que habitam o interior da planta sem causar prejuízos e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO & QUECINE, 2017). A distinção entre endófitos, epífitos e patógenos é didática. A relação endófito-planta é definida como um antagonismo balanceado que é regulado e dependente das respostas de defesa da planta, da demanda por nutrientes do microrganismo, e das condições ambientais que permeiam a interação (SCHULZ & BOYLE, 2005).

O estudo de fungos endofíticos tem sido voltado especialmente para o conhecimento da biodiversidade e também visando sua aplicação biotecnológica. O interior das plantas é reconhecido como um nicho promissor para a descoberta de fungos com novas atividades biológicas, com especial aplicação na área médica (metabólitos com potencial farmacêutico) e na agricultura (controle biológico de pragas e fitopatógenos; promoção de crescimento vegetal) (STROBEL & DAISY, 2003; ARAÚJO et al., 2014).

2.6.2. Bioprospecção de fungos endofíticos para produção de enzimas industriais

Os fungos endofíticos oferecem perspectivas para descoberta de linhagens produtoras de enzimas. Durante milhões de anos de coevolução com as plantas, eles desenvolveram uma gama de enzimas que permitem sua atuação como degradadores de polissacarídeos (SURYANARAYANAN et al., 2017). Semelhante aos fitopatógenos, os endófitos secretam enzimas para colonização da planta, como proteases, amilases, oxidases, celulases, lipases, xilanases, pectinases, entre outras (SCHULZ & BOYLE, 2005).

Os endófitos também estão envolvidos na decomposição de material vegetal e ciclagem de nutrientes após a senescência dos tecidos vegetais. Conforme relatado por SURYANARAYANAN et al. (2017), os fungos endofíticos continuam a sobreviver nos tecidos vegetais mortos e atuam como degradadores pioneiros na serapilheira antes de serem substituídos por outros fungos saprotróficos durante a decomposição de material vegetal.

Apesar do potencial biotecnológico, os fungos endofíticos não têm sido efetivamente

explorados quanto à produção de enzimas para desconstrução de biomassa lignocelulósica (SURYANARAYANAN et al., 2012; CORREA et al., 2014; SURYANARAYANAN et al., 2017). Alguns estudos tiveram como base a hipótese de que fungos naturalmente associados às plantas podem ser evolutivamente melhor adaptados para a desconstrução da biomassa da planta hospedeira. Alguns poucos estudos focados na obtenção de enzimas para sacarificação de biomassa lignocelulósica têm sido realizados com fungos endofíticos de plantas de interesse para biorrefinarias e de plantas de biomassa pouco exploradas.

Os trabalhos de SHRESTHA et al. (2011) e SHRESTHA et al. (2015) ilustram a hipótese descrita acima. Os autores não trabalharam com fungos endofíticos, mas isolaram, identificaram e caracterizaram dezenas de fungos saprofíticos de folhas em decomposição de *Miscanthus* e de cana-de-açúcar. O estudo selecionou cepas produtoras de extrato enzimático eficaz para hidrólise de biomassa de *Miscanthus* pré-tratada por método alcalino.

Com relação aos fungos endofíticos de cana-de-açúcar (*Saccharum*), pode ser citado o trabalho pioneiro de SOUSA (2017). A estratégia consistiu na realização de testes em ágar com seis fontes de carbono, seguidos de cultivo de cepas selecionadas em meio não otimizado contendo bagaço de cana pré-tratado por explosão à vapor e farelo de trigo e aplicação do extrato bruto na hidrólise desse bagaço. A prospecção de 409 linhagens permitiu a seleção de cepas de *Fusarium*, *Omnidemtus*, *Talaromyces* e *Trichoderma* produtoras de extrato enzimático eficaz para sacarificação de bagaço explodido à vapor.

Na busca por hemicelulases, ROBL et al. (2013) avaliaram 119 fungos endofíticos de diferentes plantas, incluindo *Eucalyptus* e cana-de-açúcar, e identificaram fungos para a produção de xilanases. A estratégia consistiu em testes em meio sólido contendo xilana e licor derivado do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana, seguidos de cultivo em meio contendo bagaço de cana pré-tratado por explosão à vapor deslignificado e farelo de soja. As espécies identificadas como promissoras para produção de hemicelulases foram *Aspergillus niger*, *T. atroviride*, *Alternaria* sp., *Annulohyphoxylon stigyum* e *T. wortmannii*.

Como exemplo de agregação de valor à biodiversidade de fungos endofíticos de plantas nativas de biomassa e ecossistemas pouco explorados, pode ser citado o trabalho de THIRUNAVUKKARASU et al. (2015). Esses autores isolaram fungos endofíticos da alga marinha *Sargassum wightii* com o intuito de selecionar cepas promissoras quanto à produção de xilanases com características distintas. Uma linhagem de *T. harzianum* foi selecionada como melhor produtora de xilanase e xilosidase, e a presença de NaCl no meio de cultura levou ao aumento de até três vezes na produção dessas enzimas.

Maroldi et al. (2018) investigaram 41 fungos endofíticos de plantas de manguezal. A

abordagem consistiu no uso de testes em ágar sólido contendo Avicel, seguidos de cultivo em fermentação no estado sólido utilizando farelo de trigo e aplicação do extrato na hidrólise de celulose do tipo Celluflok 200. Os autores relataram que os extratos enzimáticos produzidos por *A. niger* e *A. awamori* apresentaram valores de glicose e de conversão da celulose duas vezes superior em comparação com as linhagens padrão *A. niger* F12 e *T. reesei* Rut-C30.

Suryanarayanan et al. (2012) revisaram a produção de quitinase, L-asparaginase e tanase por fungos endofíticos. No presente trabalho, a revisão focou nas enzimas para desconstrução de lignocelulose produzidas por fungos endofíticos. A Tabela 3 resume as informações sobre as espécies de plantas das quais os fungos foram obtidos, a estratégia de prospecção e a aplicação das enzimas.

Tabela 3. Estudos de fungos endofíticos e seu potencial para produção de enzimas para desconstrução de biomassa lignocelulósica (Adaptado de SOUSA, 2017).

Espécies de plantas usadas no isolamento de endófitos	Prospecção em ágar sólido	Atividade enzimática (cultivo em FS ou FES*)	Hidrólise de biomassa lignocelulósica	Referência
<i>Cedrus deodara, Pinus roxburgii, Abies pindrow, Chlorophytum comosum</i>	celulase	celulase, xilanase, β -glicosidase	Bagaço de cana explodido à vapor	SYED et al. (2013)
<i>Laguncularia racemosa, Rhizophora mangle, Avicennia nitida</i>	celulase	endoglicanase, β -glicosidase, xilanase	Celulose do tipo Celluflok 200	MAROLDI et al. (2018)
<i>S. officinarum</i>	celulase, xilanase, pectina liase, poligalacturonase, amilase	FPase, β -glicosidase	Bagaço de cana explodido à vapor	SOUSA (2017)
<i>Eucalyptus</i> sp.	-	lacase	<i>E. globulus</i> pré-tratado por autohidrólise	FILLAT et al. (2017)
<i>E. benthamii, Platanus orientalis, Glycine max, Solanum tuberosum, S. officinarum</i>	xilanase, β -glicosidase	FPase, endoglicanase, β -glicosidase, pectinase, xilanase	-	ROBL et al. (2013)
<i>Canavalia rosea, Ipomea pescaprae, Spinifex</i> sp.	lacase	lacase	-	MUTHEZHILAN et al. (2014)
<i>Eucalyptus</i> sp.	lacase	lacase	-	FILLAT et al. (2016)
<i>Azadirachta indica, Citrus limon, Gossypium hirsutum, Magnolia champaca, Datura stramonium, Piper betle, Phyllanthus emblica</i>	celulase, amilase, protease	celulase, amilase, protease	-	PATIL et al. (2015)
<i>Sargassum wightii</i>	xilanase	xilanase, β -xilosidase	-	THIRUNAVUKKARASU et al. (2015)
<i>Catharanthus roseus, Memecylon excelsum, Glochidion borneese</i>	celulase, xilanase	celulase, xilanase	-	YOPI et al. (2017)
<i>C. roseus</i>	celulase, amilase, protease	-	-	AYOB & SIMARANI (2016)
<i>Camelia, Cinnamomum, Garcinia, Litsea, Manglietia, Trichilla</i>	celulase, xilanase, protease	-	-	LUMYONG et al. (2002)
<i>Opuntia ficus-indica</i>	celulase, xilanase, pectinase, protease	-	-	BEZERRA et al. (2012)
<i>Alpinia calcarata, Bixa orellana, Calophyllum inophyllum, C. roseus</i>	amilase, celulase, lacase, pectinase, protease	-	-	SUNITHA et al. (2013)
<i>Butea monosperma</i>	amilase, celulase, pectinase	-	-	TUPPAD &

<i>Adhathoda beddomei</i>	celulase, amilase, protease	-	-	SHISHUPALA, (2014)
<i>Brucea javanica</i>	celulase, amilase, pectinase, xilanase, ligninase,	-	-	PRABAVATHY & NACHIYAR (2012)
<i>Hedychium flavescens, H. coronarium</i>	celulase, amilase, pectinase, asparaginase, lacase	-	-	CHOI et al. (2005)
<i>Cananga odorata, Terminalia catappa, T. mantaly</i>	celulase, amilase, lacase	-	-	UZMA et al. (2016)
<i>Centella asiatica</i>	celulase, amilase, protease, lacase	-	-	TOGHUEO et al. (2017)
<i>Luehea divaricata, Trichilia elegans, Sapindus saponaria, Saccharum spp.</i>	celulase, amilase, pectinase, protease	-	-	GUPTA & CHATURVEDI (2015)
<i>Ocimum sanctum, Aloe vera</i>	amilase, celulase, quitinase, pectinase, lacase, urease	-	-	ALBERTO et al. (2016)
<i>Lantana camara</i>	amilase, lacase	-	-	YADAV et al. (2015)
<i>Asclepias sinaica</i>	amilase, pectinase, celulase, gelatinase, xilanase, tirosinase	-	-	DESIRE et al. (2014)
<i>C. asiatica</i>	amilase, celulase, protease, lacase	-	-	FOUDA et al. (2015)
<i>Boswellia sacra</i>	-	celulase, fosfatase, β -glicosidase	-	DEVI et al. (2012)
<i>Cynodon dactylon</i>	-	lacase	-	KHAN et al. (2016)
<i>Bischofia polycarpa</i>	-	celulase, lacase, peroxidase	-	WANG et al. (2006)

*FS: Fermentação submersa. FES: Fermentação no estado sólido.

Conforme pode ser observado nos dados da Tabela 3, verifica-se claramente que os fungos endofíticos têm sido investigados principalmente por meio de testes em meio de cultura sólido contendo polissacarídeos diversos. Além disso, poucos estudos avaliaram a produção quantitativa de enzimas do complexo lignocelulolítico por fermentação no estado sólido ou por fermentação submersa ou realizaram caracterização bioquímica de enzimas específicas (LONGONI et al., 2012; ROBL et al., 2013; SENGUPTA et al., 2017) (Tabela 3). Mais raros ainda são os estudos que avaliaram os extratos enzimáticos de fungos endofíticos na bioconversão ou hidrólise de biomassas lignocelulósicas. Dessa forma, considera-se uma oportunidade que essa biodiversidade fúngica endofítica associada às plantas seja explorada de modo racional visando à descoberta de novas linhagens produtoras de enzimas com aplicação industrial, fomentando assim a bioeconomia no Brasil.

2.7. REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A.; ARRIOLA, K.; JIANG, Y.; OYEBADE, A.; PAULA, E.; PECH-CERVANTES, A.; ROMERO, J.; FERRARETTO, L.; VYAS, D. Symposium review: Technologies for improving fiber utilization. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 5726-5755, 2019. ISSN 0022-0302.

AGGER, J. W.; ISAKSEN, T.; VARNAI, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G.; WESTERENG, B. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 17, p. 6287-92, 2014. ISSN 0027-8424.

AHMAD, M.; HIRZ, M.; Harald PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301-5317, 2014.

ALBERTO, R.; COSTA, A.; POLONIO, J.; SANTOS, M.; RHODEN, S.; AZEVEDO, J.; PAMPHILE, J. Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 15, n. 4, 2016. ISSN 1676-5680.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p. 4, 2010. ISSN 1754-6834.

ARAÚJO, W.; QUECINE, M.; LACAVA, P.; AGUILAR-VILDOSO, C.; MARCON, J.; LIMA, A.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J. Microorganismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização. **Santarém: UFOPA, PA, Brazil**, 2014.

ARTZI, L.; MORAG, E.; SHAMSHOUM, M.; BAYER, E.A. Cellulosomal expansin: functionality and incorporation into the complex. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 61, 2016.

AYOB, F. W.; SIMARANI, K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: Identification and its hydrolytic enzymes. **Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ**, v. 24, n. 3, p. 273-278, 2016. ISSN 1319-0164.

AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. **Springer**, 2017. ISBN 3319558048.

AZIZ, S.; SARKANEN, K. Organosolv pulping-a review. **Tappi Journal**, v. 72, p. 169–175, 1989.

BAKER, J. O.; KING, M. R.; ADNEY, W. S.; DECKER, S. R.; VINZANT, T. B.; LANTZ, S. E.; NIEVES, R. E.; THOMAS, S. R.; LI, L.-C.; COSGROVE, D. J.; HIMMEL, M. E. Investigation of the Cell-Wall Loosening Protein Expansin as a Possible Additive in the Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. In: FINKELSTEIN, M. e DAVISON, B. H. (Ed.). **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**: Proceedings of the Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 2–6, 1999, in Fort Collins, Colorado. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p.217-223. ISBN 978-1-4612-1392-5.

BEESON, W. T.; VU, V. V.; SPAN, E. A.; PHILLIPS, C. M.; MARLETTA, M. A. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. **Annu Rev Biochem**, v. 84, p. 923-46, 2015. ISSN 0066-4154.

BERENDES, F.; RAST, H-G.; VOGT, U.; GOULLOUDIS, C. Method for producing recombinant expansins. WO2001088163A1. Concessão: 22/11/2001.

BEZERRA, J. D.; SANTOS, M. G.; SVEDESE, V. M.; LIMA, D. M.; FERNANDES, M. J.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 1989-95, 2012. ISSN 0959-3993.

BINOD, P.; GNANSOUNOU, E.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Enzymes for second generation biofuels: recent developments and future perspectives. **Bioresour Technol**, v. 5, p. 317-325, 2019.

BISSARO, B.; ROHR, A. K.; MULLER, G.; CHYLENSKI, P.; SKAUGEN, M.; FORSBERG, Z.; HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; EIJSINK, V. G. H. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. **Nat Chem Biol**, v. 13, n. 10, p. 1123-1128, 2017.

BRANDT, A., GRÄSVIK, J., HALLETT, J. P., WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals—a review. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 572-581, 2015.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. ROUTES FOR CELLULOSIC ETHANOL IN BRAZIL. In Luis Augusto Barbosa Cortez (Coord.). **Sugarcane bioethanol**

— **R&D for Productivity and Sustainability**, São Paulo: Editora Edgard Blücher, p.365-380, 2014. http://dx.doi.org/10.5151/BlucherOA-Sugarcane-SUGARCANEETHANOL_37

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Steam-Exploded Sugar Cane Bagasse for On-Site Production of Cellulases and Xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 8, p. 5316-5320, 2012. ISSN 0887-0624.

CANKORUR-CETINKAYA, A.; NARRAIDO, N.; KASAVI, C.; SLATER, N.K.H.; ARCHER, D.B.; OLIVER, S.G. Process development for the continuous production of heterologous proteins by the industrial yeast, *Komagataella phaffii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 12, p. 2962-2973, 2018.

CANTAREL, B. L., COUTINHO, P. M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V., & HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233-238, 2009.

CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; SPERA, A.; ALFANI, F. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. **Biotechnol Prog**, v. 20, n. 1, p. 200-6, 2004. ISSN 8756-7938.

CAREY, D. E., YANG, Y., MCNAMARA, P. J., MAYER, B. Recovery of agricultural nutrients from biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 186-198, 2016.

CGEE. **Química Verde no Brasil 2010-2030**. Brasília, DF: 2010. 438 p. ISBN 978-85-60755-31-8. Disponível em https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/Livro_Quimica_Verde_9560.pdf

CGEE. **Second-generation sugarcane bioenergy & biochemicals: Advanced low-carbon fuels for transport and industry**. Brasília, DF: 2017. 124 p. ISBN 978-85-5569-130-0. Disponível em https://www.cgee.org.br/documents/10182/734063/Ethanol2G_web.pdf

CHANG, V. S. & HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. In: **Twenty-first Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. p. 5-37.

CHO, H. T.; COSGROVE, D. J. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 14, n. 12, p. 3237-3253, 2002.

CHOI, Y.; HODGKISS, I.; HYDE, K. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. **J Agric Technol**, v. 1, p. 55-66, 2005.

CORREA, R. C.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; DE SOUZA, C. G.; POLIZELI MDE, L.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, n. 10, p. 1467-78, 2014. ISSN 1367-5435.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

- COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 407, p. 321-326, 2000.
- COSGROVE, D. J. Microbial expansins. **Annu Rev Microbiol**, v. 71, p. 479–497, 2017.
- COSGROVE, D.J.; TAKEDA, T. The Penn State Research Foundation. Use of GR2 proteins to modify cellulosic materials and to enhance enzymatic and chemical modification of cellulose, United States Patent 20070166805, 2007.
- CREGG, J. M.; MADDEN, K.R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G.P.; STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol Cell Biol**, v.9, p. 1316–1323, 1989.
- CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Effect of a novel method for in-house cellulase production on 2G ethanol yields. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 224-229, 2017. ISSN 1878-8181.
- DAI, C.-C.; CHEN, Y.; TIAN, L.-S.; SHI, Y. Correlation between invasion by endophytic fungus *Phomopsis* sp. and enzyme production. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 11, p. 1324-1340, 2010. ISSN 1991-637X.
- DAMASCENO, L. M.; HUANG, C. Jr; BATT, C. A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 31-39, 2012.
- DELABONA PDA, S.; FARINAS, C. S.; DA SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresour Technol**, v. 107, p. 517-521, 2012. ISSN 0960-8524.
- DEMIRBAS, A. Biorefineries: current activities and future developments. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 11, p. 2782-2801, 2009. ISSN 0196-8904.
- DESIRE, M. H.; BERNARD, F.; FORSAH, M. R.; ASSANG, C. T.; DENIS, O. N. Enzymes and qualitative phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Lantana camara* Linn Leaves. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 2, p. 001-006, 2014.
- DEVI, N. N.; PRABAKARAN, J. J.; WAHAB, F. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1280-S1284, 2012. ISSN 2221-1691.
- DILOKPIMOL A.; M.R. MÄKELÄ, M.V. AGUILAR-PONTES, I. BENOIT-GELBER, K.S. HILDÉN, R.P. DE VRIES. Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties and industrial applications. **Biotechnol Biofuels**, 9, p. 231, 2016.
- DODD, D., CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Glob Change Biol Bioenergy**, v.1, n.1, p. 2-17, 2009.
- ELLILÄ, S.; FONSECA, L.; UCHIMA, C.; COTA, J.; GOLDMAN, G. H.; SALOHEIMO,

M.; SACON, V.; SIIKA-AHO, M. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnol Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 30, 2017. ISSN 1754-6834.

FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. Embrapa Instrumentação. Documentos, 54. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p.

FATMA, S., HAMEED, A., NOMAN, M., AHMED, T., SHAHID, M., TARIQ, M., TABASSUM, R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, p. 148–163, 2018.

FÁVARO, L. C. L. (2009). **Diversidade e interação de *Epicoccum spp.* com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2009. Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas. doi:10.11606/T.11.2009.tde-09092009-143442.

FÁVARO, L. C. L.; POLETTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Editora Técnica, Cristina Maria Monteiro Machado. Brasília, DF: Embrapa. p. 35-79, 2013. ISBN 978-85-7035-155-5.

FELDMAN, D. Wood - Chemistry, Ultrastructure, Reactions; Fengel, D., Wegener, G., Eds.; de Gruyter: Berlin, Germany, 1984 ; 613 pp. J. Polym. Sci.: Polym. Lett. Ed 1985, 23 (11).

FILLAT, Ú.; MARTÍN SAMPEDRO, R.; IBARRA, D.; MACAYA, D.; MARTÍN, J. A.; EUGENIO, M. E. Potential of the new endophytic fungus *Hormonema sp.* CECT 13092 for improving processes in lignocellulosic biorefineries: biofuel production and cellulosic pulp manufacture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 997-1005, 2017. ISSN 1097-4660.

FILLAT, Ú.; MARTÍN-SAMPEDRO, R.; MACAYA-SANZ, D.; MARTÍN, J. A.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, M. J.; EUGENIO, M. E. Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 589-598, 2016. ISSN 1359-5113.

FIORENTINO, G.; RIPA, M.; ULGIATI, S. Chemicals from biomass: technological versus environmental feasibility. A review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 1, p. 195-214, 2017. ISSN 1932-1031.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. DESAFIOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. **Química Nova**, v. 40, p. 1082-1093, 2017. ISSN 0100-4042.

FOUDA, A. H.; HASSAN, S. E.-D.; EID, A. M.; EWAIS, E. E.-D. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 1, p. 95-104, 2015. ISSN 0570-1783.

FRANDSEN, K. E.; LO LEGGIO, L. Lytic polysaccharide monoxygenases: a crystallographer's view on a new class of biomass-degrading enzymes. **IUCrJ**, v. 3, n. 6, p. 448-467, 2016. ISSN 2052-2525.

FROMMHAGEN, M.; KOETSIER, M. J.; WESTPHAL, A. H.; VISSER, J.; HINZ, S. W. A.; VINCKEN, J.-P.; VAN BERKEL, W. J. H.; KABEL, M. A.; GRUPPEN, H. Lytic polysaccharide monoxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 186, 2016. ISSN 1754-6834.

GARG G, SINGH A, KAUR A, SINGH R, KAUR J, MAHAJAN R. 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6:1–13.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 54, n. 6, p. 741-750, 2000.

GEORGELIS N.; NIKOLAIDIS, N.; COSGROVE, D. J. Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99(9), p. 3807-3823, 2015.

GOMES, A. R.; BYREGOWDA, S. M.; VEEREGOWDA, B. M.; BALAMURUGAN, V. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 7, p. 346-356, 2016.

GUPTA, S.; CHATURVEDI, P. Phytochemical Screening and Extracellular Enzymatic Enumeration of Foliar Endophytic Fungal Isolates of *Centella asiatica* (L.) Urban. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 35(1), No. 06, p. 21-24, 2015. ISSN 0976 – 044X.

HEMSWORTH, G. R.; JOHNSTON, E. M.; DAVIES, G. J.; WALTON, P. H. Lytic Polysaccharide Monoxygenases in Biomass Conversion. **Trends Biotechnol**, v. 33, n. 12, p. 747-61, 2015. ISSN 0167-7799.

HIMMEL, M. E.; DING, S.-Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007. ISSN 0036-8075.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012. ISSN 1754-6834.

HU, F.; RAGAUSKAS, A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. **Bioenergy Research**, v.5, n. 4, p. 1043-1066, 2012. ISSN 1939-1234.

HU, J.; CHANDRA, R.; ARANTES, V.; GOURLAY, K.; VAN DYK, J. S.; SADDLER, J. N. The addition of accessory enzymes enhances the hydrolytic performance of cellulase enzymes at high solid loadings. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 149-153, 2015. ISSN 0960-8524.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40; p. 2931-2944, 2005.

JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 2, p. 164-174, 2016. ISSN 1932-1031.

JONG, E.; HIGSON, A.; WALSH, P.; WELLISCH, M. Product developments in the bio-

based chemicals arena. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 6, p. 606-624, 2012. ISSN 1932-1031.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007. ISSN 1932-1031.

JORGENSEN, H.; PINELO, M. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 1, p. 150-167, 2017. ISSN 1932-1031.

KANG, K., WANG, S., LAI, G., LIU, G., & XING, M. Characterization of a novel *swollenin* from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 42, 2013.

KASHYAP, D.R., VOHRA, P.K., CHOPRA, S., TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n.3, p. 215-227, 2001.

KHAN, A. L.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; AL-FARSI, Z.; AL-MAMARI, A.; WAQAS, M.; ASAF, S.; ELYASSI, A.; MABOOD, F.; SHIN, J.-H. Endophytic fungi from Frankincense tree improves host growth and produces extracellular enzymes and indole acetic acid. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0158207, 2016. ISSN 1932-6203.

KIM ES, LEE HJ, BANG WG, CHOI IG, KIM KH. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnol Bioeng**, v. 102(5), p. 1342-1353, 2009.

KIM, I. J.; JUNG, J. Y.; LEE, H. J.; PARK, H. S.; JUNG, Y. H.; PARK, K.; KIM, K. H. Customized optimization of cellulase mixtures for differently pretreated rice straw. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, n. 5, p. 929-37, 2015. ISSN 1615-7591.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnol Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009. ISSN 1754-6834.

KUBICEK, C. P. The Actors: Plant Biomass Degradation by Fungi. In: (Ed.). **Fungi and Lignocellulosic Biomass**: Wiley-Blackwell, 2012. p. 29-44. ISBN 9781118414514.

KUBICEK, C. P.; KUBICEK, E. M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 35, p. 51-57, 2016. ISSN 1367-5931.

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 36, p. 1435-1438, 2009.

LEE, H. J., LEE, S., KO, H. J., KIM, K. H., & CHOI, I. G. An expansin-like protein from *Hahella chejuensis* binds cellulose and enhances cellulase activity. **Molecules and Cells**, v. 29, n. 4, p. 379-385, 2010.

LEE, H. V.; HAMID, S. B.; ZAIN, S. K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p.

1–20, 2014.

LI, L.; QU, M.; LIU, C.; XU, L.; PAN, K.; OUYANG, K.; SONG, X.; LI, Y.; LIANG, H.; CHEN, Z. Effects of recombinant swollenin on the enzymatic hydrolysis, rumen fermentation, and rumen microbiota during *in vitro* incubation of agricultural straws. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 348-358, 2019. ISSN 0141-8130.

LIAN-CHAO, L.; COSGROVE, D. J. Plant cell wall loosening activity of group 2/3 allergens of grass pollen. United States Patent, 2004/0110190 A1, 2004.

LIU, X.; LIU, C.; MA, Y.; HONG, J.; ZHANG, M. Heterologous expression and functional characterization of a novel cellulose-disruptive protein LeEXP2 from *Lycopersicon esculentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 186, p. 148-155, 2014.

LIU, X.; MA, Y.; ZHANG, M. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnol Lett**, v. 37, p. 1541, 2015.

LO LEGGIO, L.; SIMMONS, T. J.; POULSEN, J.-C. N.; FRANDBSEN, K. E.; HEMSWORTH, G. R.; STRINGER, M. A.; VON FREIESLEBEN, P.; TOVBORG, M.; JOHANSEN, K. S.; DE MARIA, L. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. **Nature Communications**, v. 6, p. 5961, 2015. ISSN 2041-1723.

LOMBARD, V.; GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D490-5, 2014. ISSN 0305-1048.

LONGONI, P.; RODOLFI, M.; PANTALEONI, L.; DORIA, E.; CONCIA, L.; PICCO, A. M.; CELLA, R. Functional analysis of the degradation of cellulosic substrates by a *Chaetomium globosum* endophytic isolate. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 10, p. 3693-705, 2012. ISSN 0099-2240.

LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H.; HYDE, K. D. Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 1109-1112, 2002. ISSN 0008-4166.

MA, J.; TAUSCHE, J. G. Pulp fiber modification using expansin or swollenin in combinations with one or more enzymes. WO2013165568A1. Depósito: 12/03/2013. Concessão: 07/11/2013.

MA, Y. Y.; WANG X, WANG HZ, ZHANG K, ZHANG MH. The expression *in vitro* and application on cellulose degradation of LeEXP2. **Adv Mat Res**. 2011;183-185:790-794. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.183-185.790>.

MACAULEY-PATRICK S.; FAZENDA, M. L.; McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.

MAROLDI, M. M. C.; VASCONCELLOS, V. M.; LACAVALA, P. T.; FARINAS, C. S. Potential of Mangrove-Associated Endophytic Fungi for Production of Carbohydrolases with

High Saccharification Efficiency. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 184(3), p. 806-820, 2017. ISSN 0273-2289.

MARTINEZ-ANAYA, C. Understanding the structure and function of bacterial expansins: a prerequisite towards practical applications for the bioenergy and agricultural industries. **Microb Biotechnol**, v. 9, n. 6, p. 727-736, 2016. ISSN 1751-7915.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. In: (Ed.). **Biofuels**: Springer, 2007. p. 95-120.

MESA, L., GONZÁLEZ, E., CARA, C., GONZÁLEZ, M., CASTRO, E., & MUSSATTO, S. I. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1157-1162, 2011.

MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA FILHO, E. X. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 165-78, 2008.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005. ISSN 0960-8524.

MUTHEZHILAN, R.; VINOTH, S.; GOPI, K.; JAFFAR HUSSAIN, A. Dye degrading potential of immobilized laccase from endophytic fungi of coastal sand dune plants. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 9, p. 4154-4160, 2014.

NOVY, V.; NIELSEN, F.; SEIBOTH, B. *et al.* The influence of feedstock characteristics on enzyme production in *Trichoderma reesei*: a review on productivity, gene regulation and secretion profiles. **Biotechnol Biofuels**, v. 12, 238, 2019.

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

PARACHIN, N. S.; ALMEIDA, J. R. M. de. Microrganismos para a produção de etanol: Fermentação de pentoses e hexoses. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, p. 189-211, 2013.

PATIL, M. G.; PAGARE, J.; PATIL, S. N.; SIDHU, A. K. Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 4, n. 3, p. 1035-1042, 2015.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015. ISSN 0009-2665.

PERE, J.; SALOHEIMO, M.; PENTTILÄ, M. Method of treatment of pulp useful for papermaking. WO2006/136656 A1. 2006.

PIERCE, B. C.; AGGER, J. W.; ZHANG, Z.; WICHMANN, J.; MEYER, A. S. A

comparative study on the activity of fungal lytic polysaccharide monooxygenases for the depolymerization of cellulose in soybean spent flakes. **Carbohydr Res**, v. 449, p. 85-94, 2017. ISSN 0008-6215.

PRABAVATHY, D.; NACHIYAR, C. V. Study on the antimicrobial activity of *Aspergillus* sp isolated from *Justicia adathoda*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 5, n. 9, p. 3317-3320, 2012. ISSN 0974-5645.

QUARANTIN A, CASTIGLIONI C, SCHÄFER W, FAVARON F, SELLA L. The *Fusarium graminearum* cerato-platanins loosen cellulose substrates enhancing fungal cellulase activity as expansin-like proteins. **Plant Physiol Biochem**. 2019; 139:229-238.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003. ISSN 0100-4042.

REN, Y., CHEN, Y., AN, J., ZHAO, Z., ZHANG, G., WANG, Y., & WANG, W. Wheat expansin gene TaEXPA2 is involved in conferring plant tolerance to Cd toxicity. **Plant Science**, v. 270, p. 245-256, 2018.

ROBL, D.; DELABONA, P. D. S.; MERGEL, C. M.; ROJAS, J. D.; COSTA, P. D. S.; PIMENTEL, I. C.; VICENTE, V. A.; DA CRUZ PRADELLA, J. G.; PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 94, 2013. ISSN 1472-6750.

RODRIGUES, D. de S.; MENDES, T. D.; PACHECO, T. F. Catálise enzimática para desconstrução de biomassa lignocelulósica. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, p. 145-187, 2013.

ROSGAARD, L.; PEDERSEN, S.; LANGSTON, J.; AKERHIELM, D.; CHERRY, J. R.; MEYER, A. S. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley straw substrates. **Biotechnol Prog**, v. 23, n. 6, p. 1270-6, 2007. ISSN 8756-7938.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 35-51, 2013.

SAMPEDRO, J., GUTTMAN, M., LI, L. C., & COSGROVE, D. J Evolutionary divergence of β -expansin structure and function in grasses parallels emergence of distinctive primary cell wall traits. **The Plant Journal**, v. 81, n. 1, p. 108-120, 2015.

SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. J. The expansin superfamily. **Genome Biology**, v. 6, n. 12, p. 242, 2005. ISSN 1474-760X.

SANDERS, J. P. M.; CLARK, J. H.; HARMSSEN, G. J.; HEERES, H. J.; HEIJNEN, J. J.; KERSTEN, S. R. A.; VAN SWAAIJ, W. P. M.; MOULIJN, J. A. Process intensification in the future production of base chemicals from biomass. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 51, p. 117-136, 2012. ISSN 0255-2701.

SANTIAGO, T. R.; PEREIRA, V. M.; DE SOUZA, W. R.; STEINDORFF, A. S.; CUNHA, B. A. D. B.; GASPAR, M.; FÁVARO, L. C. L.; FORMIGHIERI, E. F.; KOBAYASHI, A. K.; C. MOLINARI, H. B. Genome-wide identification, characterization and expression profile analysis of expansins gene family in sugarcane (*Saccharum* spp.). **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0191081, 2018.

SANTOS, C. A., FERREIRA-FILHO, J. A., O'DONOVAN, A., GUPTA, V. K., TUOHY, M. G., SOUZA, A. P. Production of a recombinant *swollenin* from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 83, 2017.

SANTOS, F. A., QUEIROZ, J. D., COLODETTE, J. L., MANFREDI, M., QUEIROZ, M. E. L. R., CALDAS, C. S., & SOARES, F. E. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol Res**, v. 109, p. 661-86, 2005. ISSN 0953-7562.

SEKI, Y., KIKUCHI, Y., YOSHIMOTO, R., ABURAI, K., KANAI, Y., RUIKE, T., SAKAGUCHI, K. Promotion of crystalline cellulose degradation by expansins from *Oryza sativa*. **Planta**, v. 241, n. 1, p. 83-93, 2015.

SENGUPTA, A.; ZABALA, A.; TAN, S. Y.; BROADSTOCK, A.; SURYANARAYANAN, T. S.; GOPALAN, V. Characterization of an ionic liquid-tolerant beta-xylosidase from a marine-derived fungal endophyte. **Biochem Cell Biol**, v. 95, n. 5, p. 585-591, 2017. ISSN 0829-8211.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 219-28, 2003. ISSN 1369-5274.

SHRESTHA, P.; IBÁÑEZ, A. B.; BAUER, S.; GLASSMAN, S. I.; SZARO, T. M.; BRUNS, T. D.; TAYLOR, J. W. Fungi isolated from *Miscanthus* and sugarcane: biomass conversion, fungal enzymes, and hydrolysis of plant cell wall polymers. **Biotechnol Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 38, 2015. ISSN 1754-6834.

SHRESTHA, P.; SZARO, T. M.; BRUNS, T. D.; TAYLOR, J. W. Systematic search for cultivatable fungi that best deconstruct cell walls of *Miscanthus* and sugarcane in the field. **Appl Environ Microbiol**, v. 77(15), p. 5490, 2011.

SILVA, C. O. G. **Tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar como ferramenta para aumentar a produção de holocelulases por *Aspergillus niger***. 2018. 139 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SILVA, C. O. G.; FERREIRA FILHO, E. X. A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. **BioEnergy Research**, v. 10, n. 2, p. 592-602, 2017. ISSN 1939-1234.

SILVA, R., FRANCO, C. M., GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulasas, ação,

produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Bol. SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

SORENSEN, A.; TELLER, P. J.; LUBECK, P. S.; AHRING, B. K. Onsite enzyme production during bioethanol production from biomass: screening for suitable fungal strains. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 164, n. 7, p. 1058-70, 2011. ISSN 0273-2289.

SOUSA, G. P. **Caracterização molecular e enzimática de fungos endofíticos de cana-de-açúcar e seu potencial para desconstrução de biomassa lignocelulósica**. Dissertação (Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. 2017.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003. ISSN 1092-2172.

SUBRAMANIYAN, S., PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n.1, p. 33-46, 2002.

SUNITHA, V.; DEVI, D. N.; SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 01-09, 2013. ISSN 1817-3047.

SURYANARAYANAN, T. S.; GOPALAN, V.; SHAANKER, R. U.; SENGUPTA, A.; RAVIKANTH, G. Translating endophyte research to applications: prospects and challenges. In: (Ed.). **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**: Springer, 2017. p. 343-365.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; GOPALAN, V. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 19-30, 2012. ISSN 1560-2745.

SWEENEY, M. D.; XU, F. Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. **Catalysts**, v. 2, n. 2, p. 244, 2012. ISSN 2073-4344.

SYED, S.; RIYAZ-UL-HASSAN, S.; JOHRI, S. . A novel cellulase from an endophyte, *Penicillium* sp. NFCCI 2862. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 4, p. 84-91, 2013.

THIRUNAVUKKARASU, N.; JAHNES, B.; BROADSTOCK, A.; RAJULU, M. G.; MURALI, T.; GOPALAN, V.; SURYANARAYANAN, T. Screening marine-derived endophytic fungi for xylan-degrading enzymes. **Curr Sci**, v. 109, n. 1, p. 112-20, 2015.

TOGHUEO, R.; ZABALGOGEAZCOA, I.; DE ALDANA, B. V.; BOYOM, F. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 146-153, 2017. ISSN 0254-6299.

TOVAR-HERRERA, O. E., BATISTA-GARCÍA, R. A., DEL RAYO SANCHEZ-CARBENTE, M., IRACHETA-CÁRDENAS, M. M., ARÉVALO-NIÑO, K., & FOLCH-

MALLOL, J. L. A novel expansin protein from the white-rot fungus *Schizophyllum commune*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p.122-296, 2015.

TUPPAD, D. S.; SHISHUPALA, S. Evaluation of endophytic fungi from *Butea monosperma* for antimicrobial and enzyme activity. **J. Med. Plants Stud**, v. 2, n. 4, p. 38-45, 2014.

UZMA, F.; KONAPPA, N. M.; CHOWDAPPA, S. Diversity and extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from medicinal plants of Western Ghats, Karnataka. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 335-342, 2016. ISSN 2314-808X.

VÁRNAI, A.; MÄKELÄ, M. R.; DJAJADI, D. T.; RAHIKAINEN, J.; HATAKKA, A.; VIIKARI, L. Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases: Occurrence in Nature, Function, and Relevance in Industrial Biomass Conversion. In: SARIASLANI, S. e GADD, G. M. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Academic Press, v.88, p.103-165, 2014. ISBN 0065-2164.

VAZ JUNIOR, S. (Ed.). *Biorrefinarias: cenários e perspectivas*. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. 175 p. ISBN 978-85-63276-02-5.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry**. Wiley New York, 1999. ISBN 0471586501.

WANG WC, LIU C, MA YY, LIU XW, ZHANG K, ZHANG M.H. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochem Eng J**. 2014;84:16-27.

WANG, J.; WU, J.; HUANG, W.; TAN, R. Laccase production by *Monotospora* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 5, p. 786-789, 2006. ISSN 0960-8524.

WYMAN, C. E., DECKER, S. R., HIMMEL, M. E., BRADY, J. W., SKOPEC, C. E., & VIIKARI, L. Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. **Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility**, v.1, p. 1023-1062, 2005.

YADAV, R.; SINGH, A. V.; JOSHI, S.; KUMAR, M. Antifungal and enzyme activity of endophytic fungi isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 29, p. 1783-1788, 2015. ISSN 1996-0808.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.; WYMAN, C. Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. **Biofuels**, v. 2, p. 421-450, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008. ISSN 1932-1031.

YENNAWAR, N. H.; LI, L.C.; DUDZINSKI, D.M.; TABUCHI, A.; COSGROVE, D.J. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 40, p. 14664-14671, 2006.

YOPI, W. T.; MELLIAWATI, R. Cellulase and Xylanase Production from Three Isolates of

Indigenous Endophytic Fungi. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 101, n. 1, p. 012035, 2017. ISSN 1755-1315.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 1, p. 46-60, 2008.

ZHANG, Y. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008. ISSN 1367-5435.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815-827, 2009.

3. PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Paullinia cupana* E *Rhizophora mangle* NO BRASIL REVELA NOVAS CEPAS ADEQUADAS PARA A DESCONSTRUÇÃO EFICIENTE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Resumo

Os fungos endofíticos são candidatos para seleção de novas cepas lignocelulolíticas. Durante milhões de anos de coevolução com as plantas, esses fungos desenvolveram um arsenal enzimático que permite sua atuação como degradadores de polissacarídeos. O guaranzeiro (*P. cupana*) é uma planta nativa da Amazônia e seus frutos são usados pela indústria de bebidas. O mangue-vermelho (*R. mangle*) é uma espécie estuarina típica dos manguezais que pode tolerar a água salgada e inundações prolongadas. Os fungos endofíticos associados a essas plantas ainda não foram sistematicamente investigados para a produção de enzimas com aplicação industrial. O objetivo desse trabalho foi avaliar uma coleção de 291 fungos endofíticos dessas plantas quanto à capacidade de produzir extratos enzimáticos eficazes para desconstrução de bagaço de cana, principal matéria-prima para o desenvolvimento da bioeconomia no Brasil. A estratégia foi baseada na caracterização molecular das linhagens associada à avaliação do perfil de degradação de 5 tipos de polissacarídeos em meio de cultura sólido. As linhagens selecionadas pelos valores de índice enzimático nessa primeira etapa foram caracterizadas com foco na obtenção de extratos enzimáticos a partir do cultivo não otimizado em meio à base de bagaço pré-tratado por autohidrólise e farelo de trigo, seguido de dosagem quantitativa de atividades enzimáticas, associada à análise de desempenho dos extratos brutos na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise. Os resultados mostraram que a maioria das 291 linhagens pertence ao filo Ascomycota, sendo possível identificar 23 gêneros diferentes; os mais frequentes foram *Clonostachys*, *Diaporthe*, *Fusarium* e *Trichoderma*. Com base na análise estatística dos dados de caracterização enzimática das 291 cepas foi possível selecionar 27 fungos, os quais apresentaram os maiores valores de crescimento em meio com celulose microcristalina e os maiores índices enzimáticos em meio contendo carboximetilcelulose, amido, xilana e pectina. Estas linhagens selecionadas pertencem a grupos taxonômicos que não têm sido explorados industrialmente para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (*Neofusicoccum*, *Paraconiothyrium*, *Diaporthe*, *Talaromyces*, *Neopestalotiopsis*, *Clonostachys*, *Annulohyphoxylon*). Com base na produção de FPase, endoglicanase, β -glicosidase e xilanase, bem como em relação ao desempenho dos extratos (secretomas) na hidrólise de bagaço pré-tratado por autohidrólise, o extrato oriundo da cepa *T. amestolkiae* CP230 foi selecionado. Este extrato alcançou uma produção de glicose de 5,163 g/L nas condições utilizadas (5% de teor de sólidos; 200 rpm; 50°C; 24 h). Em seguida, dois tipos de bagaço foram avaliados como indutores da produção enzimática pela cepa CP230 (tratado por autohidrólise e tratado por organosolv). O desempenho de hidrólise dessas mesmas biomassas com os extratos de *T. amestolkiae* CP230 foi semelhante ao alcançado com o coquetel enzimático comercial Cellic CTec 3 quando aplicado como catalisador na hidrólise do bagaço pré-tratado (com 5,0% de teor de sólidos; 3,3 FPU/g de biomassa; 50°C; 200 rpm; 24 horas). Os dados indicam que os fungos endofíticos de plantas tropicais de ambientes pouco explorados são uma fonte prolífica de novas linhagens produtoras de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas para suplementar coquetéis enzimáticos para sacarificação de biomassa, ou mesmo para a completa conversão da celulose do bagaço de cana pré-tratado a açúcares fermentescíveis.

Palavras-chave: endófitos; fungos filamentosos; Amazônia; manguezal; bioprospecção; celulase; hemicelulase; bagaço; *Talaromyces amestolkiae*; *Saccharum*; autohidrólise; organosolv.

3. SURVEYING OF *Paullinia cupana* E *Rhizophora mangle* ENDOPHYTIC FUNGI IN BRAZIL REVEALS NEW STRAINS SUITABLE FOR THE EFFICIENT DECONSTRUCTION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS

Abstract

Endophytic fungi are candidates for selection of new lignocellulolytic strains. During millions of years of coevolution with plants, these fungi have developed a catalytic inventory that allows them to act as polysaccharide degraders. Guaranazeiro (*P. cupana*) is a native plant of the Amazon and its fruits are used by the beverage industry. Red mangrove (*R. mangle*) is a typical mangrove estuarine species that can tolerate salt water and prolonged flooding. The endophytic fungi associated with these plants have not been systematically investigated for the production of enzymes with industrial application. The objective of this work was to evaluate a collection of 291 endophytic fungi from these plants for their ability to produce enzymatic extracts effective for deconstructing sugarcane biomass, the main raw material for the development of bioeconomy in Brazil. The strategy was based on the molecular characterization of the strains associated with the evaluation of the degradation profile of 5 polysaccharides in solid culture medium. The strains selected by the enzymatic index value in this first screening were further characterized with a focus on obtaining enzyme crude extracts from non-optimized cultivation in bagasse-based culture medium pretreated by autohydrolysis and wheat bran followed by enzymatic activity quantification. Crude extracts were also evaluated for hydrolysis performance on sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis. The results showed that most of the 291 strains belong to the Ascomycota phylum, being possible to identify 23 different genera; The most common were *Clonostachys*, *Diaporthe*, *Fusarium*, and *Trichoderma*. Based on the statistical analysis of the enzymatic characterization data of 291 strains it was possible to select 27 fungi, which presented the highest growth values in medium with microcrystalline cellulose and the highest enzymatic indexes in media containing carboxymethylcellulose, starch, xylan, and pectin. These 27 selected strains belong to taxonomic groups that have not been industrially exploited for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes (*Neofusicoccum*, *Paraconiothyrium*, *Diaporthe*, *Talaromyces*, *Neopestalotiopsis*, *Clonostachys*, *Annulohypoxylon*). Based on the production of FPase, endoglycanase, β -glycosidase, and xylanase, as well as regarding the performance of the crude extracts in the hydrolysis of sugarcane pretreated bagasse, the extract from the *T. amestolkiae* CP230 strain was selected. The application of this extract achieved a glucose yield of 5.163 g / L under the conditions used (5% solids content; 200 rpm; 50°C; 24 h). Then, two types of bagasse were evaluated as inducers of enzyme production by strain CP230 (autohydrolysed and organosolv-treated). The hydrolysis performance of these same biomasses with *T. amestolkiae* CP230 crude extracts was similar to that achieved with the commercial Cellic CTec 3 enzymatic cocktail when applied as a catalyst in the pretreated bagasse hydrolysis (3,3 FPU/g biomass; 5% solids content; 200 rpm; 50°C; 24 h). The data indicate that endophytic fungi of tropical plants from underexplored environments are a prolific source of new cellulolytic and hemicellulolytic enzyme producing strains to supplement enzymatic cocktails for biomass saccharification, or even for the complete conversion of pretreated sugarcane bagasse to fermentable sugars.

Keywords: endophytes; filamentous fungi; Amazon; mangrove; bioprospecting; cellulase; hemicellulase; bagasse; *Talaromyces amestolkiae*; *Saccharum*; autohydrolysis; organosolv.

3.1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é considerada uma fonte alternativa e sustentável para produção de biocombustíveis, de produtos químicos e de materiais. A valorização da biomassa lignocelulósica deve favorecer a transição de uma economia baseada em carbono fóssil para uma economia baseada no uso eficiente e sustentável de recursos biológicos (chamada bioeconomia) (ARUNDEL & SAWAYA, 2009; USA, 2016; European Commission, 2018), limitando assim a emissão de gases de efeito estufa e as mudanças climáticas (UNITED NATIONS).

Entre os resíduos agroindustriais lignocelulósicos mais abundantes do Brasil estão os que são gerados pelo setor sucroalcooleiro energético (bagaço de cana e palha) (CGEE, 2016). A cana-de-açúcar (*Saccharum*) é considerada a principal biomassa para o desenvolvimento de biorrefinarias de lignocelulose, não apenas para a conhecida produção de etanol, açúcar, bioeletricidade e alimentação animal, mas também para a obtenção de diversos produtos (CONAB, 2019). Isso, por sua vez, depende da degradação dos polissacarídeos que compõem a lignocelulose, o que envolve especialmente o uso de enzimas lignocelulolíticas.

Nesse sentido, os fungos filamentosos desempenham um papel crucial como biocatalisadores nas biorrefinarias de resíduos lignocelulósicos, devido à sua capacidade de produzir enzimas que podem clivar essas estruturas recalcitrantes (FERREIRA et al., 2016; TROIANO et al., 2020). Esse papel de destaque é reforçado pelo fato de que muitos bioprodutos de alto valor agregado (p. ex.: enzimas) são produzidos por fungos filamentosos em substratos à base de açúcares (PANDEY et al., 2015). Entretanto, tem havido um interesse crescente em usar outros substratos mais econômicos para tal finalidade, como os resíduos industriais, principalmente resíduos industriais lignocelulósicos (FERREIRA et al., 2016; TROIANO et al., 2020).

No caso das biorrefinarias de lignocelulose, atualmente é necessária a utilização de um pré-tratamento efetivo da biomassa, seguido da adição de elevada carga de enzimas lignocelulolíticas para sobrepor fatores limitantes do substrato e das enzimas, que dificultam a hidrólise enzimática (sacarificação) dos polissacarídeos (BINOD et al., 2019). Os fungos filamentosos produzem a maioria das preparações comerciais de enzimas para degradação da lignocelulose (KUBICEK, 2012). Tais preparações são misturas de diferentes enzimas em uma composição ou coquetel (BINOD et al., 2019).

É nesse contexto que a obtenção de novas cepas (selvagens ou recombinantes) produtoras de extratos enzimáticos eficientes para a degradação da biomassa lignocelulósica

tem ganhado importância (ELLILÄ et al., 2017), principalmente na situação atual em que a customização de enzimas para cada tipo de biomassa tem se tornado indispensável para a viabilidade econômica das biorrefinarias (SØRENSEN et al., 2011; LIU et al., 2016; FLORENCIO et al., 2017; BINOD et al., 2019). Nesse aspecto, a produção *on-site* de enzimas desenvolvidas especificamente para a biomassa alvo utilizando este mesmo material como substrato de cultivo de fungos pode reduzir os custos do processo de sacarificação (SMITH et al., 2014; JOHNSON, 2016; LIU et al., 2016; BINOD et al., 2019).

As enzimas necessárias para a hidrólise completa de materiais lignocelulósicos incluem celulasas, hemicelulasas, pectinases, esterases, ligninases e outras enzimas auxiliares, tais como as mono-xigenases líticas de polissacarídeos. Essas enzimas podem ser produzidas por uma ampla variedade de microrganismos, especialmente por fungos filamentosos (KUBICEK, 2012). Embora a biodiversidade de fungos seja extraordinária, com cerca de 1,5 milhões de espécies estimadas (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017), apenas cinco gêneros da classe Ascomycota (*Aspergillus*, *Humicola*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*) produzem 60% das enzimas usadas em processos industriais diversos (ØSTERGAARD & OLSEN, 2011; SURYANARAYANAN et al., 2012). Estes ascomicetos são considerados chassi para produção industrial por apresentarem características importantes para bioprocessos, como altas taxas de secreção de proteínas (BENOCCI et al., 2017).

Para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos específicos para determinada biorrefinaria de lignocelulose, a biodiversidade fúngica tem sido explorada cada vez mais pela adoção de estratégias robustas de bioprospecção. Tais estratégias envolvem principalmente a incorporação de materiais lignocelulósicos no meio de cultivo basal como fonte de carbono, e especialmente, a análise de desempenho dos extratos brutos (isto é, dos secretomas; individualizados ou como suplemento de preparações enzimáticas disponíveis) na hidrólise da biomassa de interesse, como critérios para seleção de linhagens promissoras (KOVÁCS et al., 2008; BERRIN et al., 2012; RAVALASON et al., 2012; SOUSA, 2017; JAIN & AGRAWAL, 2018). Além disso, a prospecção de fungos de diferentes grupos ecológicos e ecossistemas é uma estratégia útil para a descoberta de enzimas mais eficientes e com novas propriedades catalíticas (KING et al., 2011; GIBSON et al., 2011; BERRIN et al., 2012; SURYANARAYANAN et al., 2012; SEPPÄLÄ et al., 2017; THANH et al., 2019).

Nesse contexto, os fungos endofíticos constituem uma importante fonte de novas cepas com propriedades metabólicas e catalíticas diversas. Esses fungos estão presentes no interior de todas as espécies conhecidas de plantas e são definidos como aqueles que podem ou não crescer em meio de cultura e que habitam o interior da planta sem causar prejuízos e

sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO & ARAÚJO, 2007).

Embora bastante estudados quanto à biodiversidade e produção de metabólitos bioativos, a produção de enzimas industriais por fungos endofíticos não tem sido extensivamente explorada, apesar de sua capacidade de produção de enzimas degradadoras de parede celular vegetal para colonização do hospedeiro (SCHULZ & BOYLE, 2005; SURYANARAYANAN et al., 2012; CORREA et al., 2014; SURYANARAYANAN et al., 2017). Com relação às enzimas lignocelulolíticas, os estudos existentes sobre endófitos relataram etapas de triagem em substratos sintéticos ou produção de enzimas em fermentação no estado sólido ou submersa (SENGUPTA et al., 2017; LONGONI et al., 2012; ROBL et al., 2013), porém, poucos estudos avaliaram o desempenho das enzimas ou extratos em uma biomassa lignocelulósica pré-tratada (SOUSA, 2017; MARQUES et al., 2018).

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo e está situada no maior bioma brasileiro, o bioma Amazônia. Ela é caracterizada pela ampla diversidade biológica e heterogeneidade de seus ecossistemas, bem como pelo alto grau de endemismo (ICMBio, 2018). Alguns estudos têm sido realizados com foco na prospecção de fungos lignocelulolíticos desse bioma, especialmente em amostras de solos amazônicos, e têm permitido, por exemplo, a seleção de linhagens promissoras de *Trichoderma* produtoras de enzimas para sacarificação de biomassa lignocelulósica (KOVÁCS et al., 2008; SOUZA et al., 2011; DELABONA et al., 2012; PANSA, 2017). No entanto, apesar das plantas tropicais serem consideradas verdadeiros reservatórios de diversidade de fungos endofíticos (ARNOLD, 2007; BLACKWELL, 2011), verifica-se uma escassez de estudos com foco na busca de novas linhagens lignocelulolíticas a partir de plantas desse bioma.

O guaranazeiro (*Paulinia cupana* var. *sorbilis*; família *Sapindaceae*) é uma dicotiledônea nativa da Amazônia e seus frutos são usados pela indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética. Seu cultivo é de importância sócio-econômica para a região, movimentando vários setores da economia (DO NASCIMENTO FILHO et al., 2001). Com relação à diversidade de fungos endofíticos do guaranazeiro, alguns estudos têm sido realizados (DE FREITAS SIA et al., 2013; ELIAS, 2015; BATISTA et al., 2017), no entanto, fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum* estão entre os mais estudados nesta cultura (BONATELLI et al., 2016). Na última década, um consórcio de pesquisa sobre a microbiota endofítica do guaranazeiro foi realizado entre a Universidade de São Paulo e a Universidade Federal do Amazonas (FAPESP, 2010). Parte da coleção de fungos endofíticos do guaranazeiro obtida por esse consórcio encontra-se preservada nos bancos de germoplasma da Embrapa e pode ser prospectada para diferentes finalidades.

Outro ambiente tropical de interesse para a prospecção de novos fungos lignocelulolíticos é o ecossistema manguezal. As plantas e as comunidades microbianas desse ambiente são consideradas adaptadas a uma condição extrema que combina alta salinidade, inundações de maré, ventos fortes e altas temperaturas (ALONGI, 2002). De fato, as plantas típicas de manguezal abrigam uma alta diversidade de fungos endofíticos (SEBASTIANES *et al.*, 2017). Entre as pesquisas sobre bioprospecção de fungos endofíticos de plantas de manguezal para produção de enzimas lignocelulolíticas pode ser citado o trabalho de MAROLDI *et al.* (2017). Os autores investigaram 41 cepas endofíticas de folhas e ramos de *Avicennia nitida*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* e selecionaram cepas de *Aspergillus* produtoras de extrato enzimático com elevado desempenho na hidrólise de celulose sintética, revelando o potencial desses fungos para produção de enzimas industriais, apesar de não terem avaliado os extratos enzimáticos em um processo de sacarificação de biomassa lignocelulósica.

Considerando o amplo espectro de aplicações biotecnológicas de fungos endofíticos de plantas tropicais, o objetivo deste trabalho foi caracterizar uma coleção de fungos endofíticos de plantas da Amazônia e de manguezal visando à seleção de novas cepas produtoras de extrato enzimático eficiente para hidrólise de biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada por autohidrólise. A estratégia utilizada foi baseada na caracterização molecular dos 291 fungos prospectados visando à sua classificação taxonômica, associada à avaliação do perfil de degradação de polissacarídeos utilizando testes em meio sólido com cinco fontes de carbono distintas. Em seguida, as melhores cepas foram cultivadas em bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise e os extratos brutos (secretoma) foram investigados tanto em relação às atividades enzimáticas (FPase, endoglicanase, β -glicosidase e xilanase) quanto em relação ao seu desempenho na hidrólise desta mesma biomassa, em comparação com enzima comercial (Cellic CTec 3). Uma análise mais detalhada é apresentada para a cepa selecionada CP-230 (do bioma Amazônia), a qual foi identificada como *Talaromyces amestolkiae*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Fungos utilizados, determinação de viabilidade e pureza

Os fungos endofíticos avaliados (256 cepas provenientes de *P. cupana* e 35 de *R. mangle*) foram previamente isolados de raízes, folhas ou ramos de plantas de cultivo comercial de guaranazeiro em Manaus (Amazonas) e em áreas de manguezais de Cananéia e Bertioga (São Paulo). O isolamento foi realizado por desinfecção superficial (ARAÚJO *et al.*,

2014), sendo que os fungos endofíticos das plantas de manguezal foram isolados na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Universidade de São Paulo) (Projeto Fapesp 04/13910-6) e os fungos do guaranazeiro foram isolados na Universidade Federal do Amazonas (Projeto Fapesp 09/53376-2). As cepas foram transferidas para a Embrapa Agroenergia mediante acordo de cooperação técnica. As autorizações de acesso ao patrimônio genético concedidas pelos órgãos competentes para a realização de pesquisa com esses fungos são as de número 02001.008898/2012-21 (CGEN) e A57A858 (SISGEN).

Para a avaliação da viabilidade e pureza, os fungos foram transferidos do estoque original (método de CASTELLANI, 1967) para meio de cultura BDA (batata dextrose agar) (Sigma-Aldrich). Este é um meio comercial em conformidade com as especificações da Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) e também com a Farmacopéia Brasileira (2010). É um meio à base de infusão de amido de batata e glicose que favorece o crescimento de fungos filamentosos e leveduriformes dos principais filos do Reino Fungi (BEEVER & BOLLARD, 1970). O meio foi acrescido de antibióticos (estreptomicina e penicilina, 50 µg/mL) para impedir o eventual crescimento de bactérias contaminantes. As placas foram incubadas a 28°C por até 10 dias em câmara de crescimento com fotoperíodo. Após o crescimento, os fungos purificados foram preservados pelo método de CASTELLANI (1967). Para tanto, discos de oito mm de diâmetro com micélio foram transferidos de culturas jovens para tubos com tampa de rosca de cinco mL, contendo água destilada esterilizada. Os 291 fungos encontram-se preservados na coleção de “*Microorganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias - CMMAABio*” da Embrapa Agroenergia (Brasília/DF). Informações mais detalhadas sobre as cepas são mostradas no Anexo 1.

O fungo mutante hipercelulolítico *T. reesei* RUT C-30 (ATCC® 56765™) foi utilizado nos experimentos de produção de enzimas. Esta cepa é considerada padrão para estudos de produção de celulasas, sendo reconhecida pela produção de exo e endoglicanases. A linhagem foi mantida pelo método Castellani (1967).

3.2.2. Caracterização molecular de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle*

3.2.2.1. Cultivo e extração de ácidos nucleicos

Os 291 fungos foram cultivados em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio Potato Glucose Agar (Sigma-Aldrich), com 50 µg/mL de penicilina. Após o crescimento, fragmentos de micélio foram coletados e transferidos para tubos do tipo Falcon de 50 mL, contendo 15 mL de meio de cultura PDB (Potato Dextrose Broth, Sigma-Aldrich). Os fungos foram incubados a 28°C sob agitação (200 rpm) por até 10 dias. Após o cultivo, o micélio foi

coletado com auxílio de uma espátula esterilizada e transferido para uma folha de papel filtro esterilizado (Papel Filtro Qualitativo 80 g 150 mm, Unifil). O micélio seco foi embrulhado em folhas de papel alumínio esterilizado e armazenado em freezer (-20°C).

A maceração foi realizada com nitrogênio líquido até apresentar aspecto de um pó fino e em seguida esse material foi submetido à extração de ácidos nucléicos conforme a metodologia de RAEDER & BRODA (1985), com modificações. As modificações consistiram na realização de um número maior de lavagens com os solventes fenol e clorofórmio (duas a três lavagens ao invés de uma) e no tratamento com RNase, que era a última etapa e passou a ser realizada após a incubação do macerado a 65°C no tampão de extração. A quantificação e a qualidade dos ácidos nucléicos foram avaliadas tanto por análise em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific), quanto por análise em gel de agarose 1%, em comparação com DNA de bacteriófago lambda com concentrações conhecidas (25, 50, 75 e 100 ng/μL). O gel de agarose foi fotodocumentado sob luz UV e o ácido nucléico foi preservado em freezer (-20°C).

3.2.2.2. Amplificação por PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico e de outros genes, purificação dos produtos e sequenciamento

O DNA genômico extraído de cada uma das 291 cepas foi utilizado como molde em reações de PCR para amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossômico com os primers ITS1-F (GARDES & BRUNS, 1993) e ITS-4 (WHITE *et al.*, 1990), os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 570-600 pares de bases (pb). As reações de amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 foram preparadas em volume de 50 μL contendo 0,2 mM de dNTPs; 3,7 mM de MgCl₂; tampão 1X Colorless GoTaq® Flexi Buffer pH 8,5 (Promega); 1,5 Unidades de GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega); 0,8 μM de cada primer e 20 ng de DNA genômico. A reação de PCR foi realizada em termociclador (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 55°C por 30 seg, extensão a 72°C por 30 seg) e extensão final a 72°C por 10 min.

Para os fungos selecionados para hidrólise enzimática (27 cepas), além da região ITS1-5,8S-ITS2, outros marcadores foram amplificados por PCR: β-tubulin; calmodulin; actin; e translation elongation factor 1 alpha (EF-1α). As condições de amplificação para cada um destes alvos é descrita a seguir.

A amplificação por PCR de uma região específica do gene β-tubulina foi realizada com os primers Bt2a e Bt2b (GLASS & DONALDSON, 1995), os quais amplificam um

fragmento de aproximadamente 350 pb. As reações de amplificação foram preparadas em volume de 50 µL contendo 0,2 mM de dNTPs; 3,7 mM de MgCl₂; tampão 1X Colorless GoTaq® Flexi Buffer pH 8,5 (Promega); 1,5 Unidades de GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega); 0,2 µM de cada primer e 20 ng de DNA genômico. A reação de PCR foi realizada em termociclador (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 58°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min) e extensão final a 72°C por 10 min.

A amplificação por PCR do gene calmodulina foi realizada com os primers CMD5 e CMD6 (HONG et al., 2005), os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 570 pb. As reações de PCR e as condições de amplificação foram semelhantes às descritas para o gene β-tubulina, exceto a temperatura de anelamento dos primers, que foi de 55°C, conforme indicado por SAMSON et al. (2014).

A amplificação por PCR do gene actina foi realizada com os primers ACT-512F e ACT-783R (CARBONE & KOHN, 1999), os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 300 pb. As reações de amplificação foram preparadas em volume de 50 µL contendo 0,2 mM de dNTPs; 2 mM de MgCl₂; tampão 1X Colorless GoTaq® Flexi Buffer pH 8,5 (Promega); 1,5 Unidades de GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega); 0,5 µM de cada primer e 20 ng de DNA genômico. A reação de PCR foi realizada em termociclador (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 61°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min) e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a amplificação do gene EF-1α (*translation elongation factor 1 alpha*) foram utilizados os primers EF1-728F e EF1-986R (CARBONE & KOHN, 1999), os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 350 pb. As reações de PCR e as condições de amplificação foram semelhantes às descritas para o gene actina, exceto a temperatura de anelamento dos primers, que foi de 58°C.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% com marcador de peso molecular de 1 Kb e fotodocumentados sob luz UV. Em seguida, os produtos de reação foram purificados com auxílio de Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), quantificados e sequenciados com os respectivos primers utilizados nas amplificações. O sequenciamento foi realizado para ambas as fitas (senso e antisenso) pela empresa Eurofins do Brasil (Indaiatuba, São Paulo).

3.2.2.3. Análise de sequências

As sequências foram analisadas com auxílio dos softwares *Staden Package* (STADEN *et al.*, 2000) ou Geneious R11 (<https://www.geneious.com>) para verificação da qualidade e obtenção das sequências consenso. As sequências de boa qualidade foram analisadas com a ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra diferentes bases de dados: GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Mycobank (<http://www.mycobank.org/>), e Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>). No caso do GenBank, a análise foi realizada tanto na base de dados global quanto na base de dados “*Sequences from type material*”. Para o gênero *Fusarium*, também foi utilizada a base de dados Fusarium-ID (<http://isolate.fusariumdb.org/blast.php>) (GEISER *et al.*, 2004). Os resultados foram apresentados em tabela e somente as sequências com 100% de identidade àquelas de linhagens tipo (*type strains*) foram classificadas ao nível de espécie. Para as cepas cuja única sequência obtida foi a da região ITS do rDNA, a classificação foi apresentada ao nível de gênero, exceto quando a identidade com sequência oriunda de *type strain* foi de 100%.

3.2.3. Caracterização enzimática de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle*

3.2.3.1. Triagem primária: avaliação de 291 cepas quanto à capacidade de degradação de polissacarídeos em meio de cultura sólido

Para a caracterização enzimática dos fungos foram realizados testes de crescimento e de degradação em meio de cultura sólido contendo diferentes polissacarídeos como fonte de carbono: carboximetilcelulose (*CMC sodium salt, low viscosity*, Sigma-Aldrich), xilana de madeira de faia (Sigma-Aldrich), pectina (*from citrus peel*, Sigma-Aldrich), amido solúvel (Sigma-Aldrich) e celulose microcristalina (Avicel PH-101, Sigma-Aldrich). Cada uma das 291 cepas foi retirada do estoque e inoculada em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura BDA (Sigma-Aldrich). A incubação foi realizada a 25°C por sete dias. Essa condição de cultivo foi escolhida com base na análise anterior de viabilidade e pureza dos fungos, pois demonstrou ser adequada para o crescimento e desenvolvimento de todas as cepas. Após o crescimento, os fungos foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura (Meio Mínimo) contendo cada polissacarídeo a ser avaliado: 1% de carboximetilcelulose, xilana ou amido. Para avaliação da degradação de pectina utilizou-se meio mínimo com 0,5% de pectina, ajustado para pH 5 e 7. A preparação destes meios de cultura e a análise estatística dos experimentos são descritas a seguir.

Para a avaliação, foi utilizada a solução de sais de *A. nidulans* (PONTECORVO *et al.*, 1953) a qual contém (g/L): NaNO₃ 6,0; KCl 0,5; KH₂PO₄ 1,5; MgSO₄ 0,5; ZnSO₄ 0,001;

FeSO₄ 0,001. A esta solução foram adicionados 10 g/L de celulose microcristalina e o pH foi ajustado para 6,8. Ágar bacteriológico foi adicionado (15 g/L) e o meio foi esterilizado em autoclave. A inoculação foi realizada pela transferência de um disco de micélio de oito mm de diâmetro para o centro das placas de Petri. A incubação foi realizada por 4 dias a 25°C e após este período os diâmetros das colônias foram mensurados com auxílio de paquímetro digital (diâmetro perpendicular). O delineamento foi do tipo inteiramente casualizado com três repetições. Os dados de crescimento em Avicel foram analisados com o software Genes (CRUZ, 2008), com análise de variância seguida de comparação das médias por meio do teste de Scott-Knott (1974) para separar as médias em grupos, ao nível de 5% de significância.

Os meios de cultura contendo CMC, xilana e amido foram preparados com solução de sais de *A. nidulans* (PONTECORVO *et al.*, 1953) descrita anteriormente. A esta solução de sais foram adicionados, respectivamente, 1% de CMC, 1% de xilana e 1% de amido como fontes de carbono. O pH foi corrigido para 6,8 e ágar bacteriológico foi adicionado (15 g/L). Após a esterilização em autoclave, 0,1% de Triton X-100 esterilizado foi adicionado aos meios de cultura com o intuito obter melhor visualização do halo, para que o crescimento não fosse total na placa e fosse possível mensurar a degradação enzimática em cada substrato.

O meio de cultura para avaliação da degradação de pectina foi preparado de acordo HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975). O meio de cultura é composto por (g/L): extrato de levedura 1,0; pectina cítrica 5,0; ágar 20,0 e 50 mL de solução de sais 10x concentrada. A solução de sais 10x concentrada foi preparada com: 20 g/L de (NH₄)₂SO₄; 40 g/L de KH₂PO₄; 60 g/L de Na₂HPO₄; 2 g/L de FeSO₄; 0,01 g/L de CaCl₂; 0,0001 g/L de H₃BO₃, 0,001 g/L de MnSO₄; 0,0001 g/L de ZnSO₄; 0,005 g/L de CuSO₄. Após a homogeneização de todos os reagentes, o pH foi corrigido para 5,0 e para 7,0 e, após esterilização, foi adicionado 0,1% de Triton X-100 esterilizado ao meio. O meio de cultura com pH 5,0 é indicado para a detecção de poligalacturonase e o meio com pH 7,0 para detecção de pectina liase.

Todas as 291 cepas foram inoculadas em triplicata nos 5 meios de cultivo (CMC, xilana, amido, pectina pH 5,0 e pectina pH 7,0) e foram incubadas a 25°C por 6 dias. Em seguida, as placas foram examinadas para determinação do índice enzimático, conforme descrito a seguir: a) Xilana e pectina (pH 7,0 e 5,0): Primeiramente delimitou-se a região do crescimento do fungo (diâmetro da colônia). Posteriormente, 5 mL de solução de iodo (iodeto de potássio: 3 g; iodo ressublimado: 1g; água destilada: 100 mL) foram adicionados na superfície e as placas foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 15 min e posteriormente foram lavadas com água destilada; o halo de degradação (diâmetro do halo) foi mensurado com auxílio de paquímetro digital. b) Amido: Após a delimitação da região do

crescimento do fungo, aproximadamente 5 mL de solução de iodo foram adicionados nas placas, as quais foram imediatamente lavadas com água destilada para revelação dos halos de degradação; o halo de degradação foi mensurado com auxílio de paquímetro digital. c) CMC: Após delimitar a região do crescimento do fungo, cerca de 10 mL de solução de vermelho congo (0,1%) foram adicionados na superfície das colônias e as placas permaneceram em repouso por 30 min à temperatura ambiente; posteriormente foi realizada a lavagem das placas com uma solução de NaCl 1M; o halo de degradação formado foi mensurado.

A degradação enzimática dos substratos foi determinada por meio do cálculo do índice enzimático (IE), que consiste na razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro das colônias (IE: diâmetro do halo/ diâmetro da colônia). Os dados de IE foram analisados com o software Genes (CRUZ, 2008); foi realizada análise de variância seguida de comparação das médias por teste de Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de significância.

Com base na análise estatística dos dados de caracterização enzimática, linhagens foram selecionadas considerando os seguintes critérios: maiores diâmetros de crescimento em meio contendo celulose microcristalina; maiores valores de índice enzimático em meio contendo os polissacarídeos CMC, amido, xilana e pectina (com pH 5,0 e pH 7,0); tipo de perfil de degradação de polissacarídeos (degradação exclusiva e/ou simultânea dos polissacarídeos); classificação taxonômica. Adicionalmente às análises estatísticas, gráficos do tipo *heatmap* (construídos em planilhas Microsoft Excel utilizando a ferramenta de formatação condicional) foram obtidos para melhor visualização das classes fenotípicas obtidas (definidas com base no perfil de degradação dos polissacarídeos CMC, xilana, pectina e amido, e nas médias de crescimento em celulose microcristalina). Esta metodologia para seleção de cepas com base na produção de enzimas em meio contendo diferentes polissacarídeos foi escolhida pois acredita-se que os fungos selecionados podem ter potencial para degradar os componentes da biomassa lignocelulósica. Porém vale ressaltar que existem gargalos como estabilidade e inibições que podem interferir nesse processo.

Dessa forma, 27 linhagens foram definidas para avaliação em uma segunda etapa, no cultivo em fermentação submersa tendo bagaço pré-tratado por autohidrólise como fonte indutora da produção de enzimas. Em seguida, os 27 extratos brutos obtidos (secretomas) foram submetidos à quantificação de atividades enzimáticas e aqueles extratos com maior valor de FPase foram avaliados quanto a liberação de açúcares redutores na hidrólise do bagaço pré-tratado por autohidrólise.

3.2.3.2. Triagem secundária: obtenção de extrato enzimático (secretoma) de cepas selecionadas, dosagem de atividades enzimáticas e análise de desempenho dos extratos na hidrólise de biomassa lignocelulósica

Obtenção de extratos enzimáticos brutos (secretomas) de fungos selecionados

Os 27 fungos selecionados foram reativados a partir do estoque por meio de crescimento em meio de cultura Potato Glucose Agar (Sigma-Aldrich) a 25°C durante 7 dias (condição definida como adequada para o crescimento conforme descrito anteriormente nos Materiais e Métodos). Este cultivo serviu como fonte de inóculo para a produção de enzimas em condições de fermentação submersa, conforme detalhado adiante.

O meio de produção de enzimas teve bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por autohidrólise (tratamento hidrotérmico) como fonte indutora. Para isso foi necessário realizar o pré-tratamento da biomassa. O bagaço de cana foi doado pela Usina Jalles Machado (Goianésia, GO). O pré-tratamento foi realizado em um reator de processos químicos de 5L (autohidrólise), usando 300 g (peso seco) da biomassa e 3L de água. O reator foi gradualmente aquecido até atingir 180°C, para posteriormente iniciar a reação durante 50 minutos e agitação a 600 rpm. Após o tempo de reação, as amostras foram esfriadas e filtradas para retirar a água livre. Para utilização no meio de cultivo dos fungos, esse bagaço pré-tratado foi seco, triturado e armazenado à temperatura ambiente até o momento do uso.

O bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise (ou tratamento hidrotérmico) foi escolhido, pois esse tratamento apresenta algumas vantagens: ele consiste na utilização de água submetida a condições de altas temperaturas (150-230°C) e pressão para o fracionamento da biomassa na ausência de reagentes químicos, o que é uma das grandes vantagens em relação a outros tratamentos; é um tratamento seletivo para a retirada de hemicelulose, havendo pouca degradação da celulose, característica essencial para a viabilização técnico-econômica de biorrefinarias de lignocelulose produtoras de etanol celulósico, por exemplo; essa baixa degradação minimiza também a formação de inibidores que podem prejudicar o desempenho das etapas subsequentes (hidrólise enzimática ou fermentação) (CARVALHO, 2018). Outro fator que contribuiu para a escolha desse tipo de bagaço pré-tratado foi o fato de que as características e a composição da biomassa pré-tratada resultante são semelhantes às obtidas pelo pré-tratamento por explosão à vapor, o qual já é utilizado no Brasil em algumas plantas de produção de etanol de segunda geração, comerciais ou demonstrativas (CHANDEL et al., 2019). Além disso, uma metodologia que considera a reutilização da água durante o processo de autohidrólise foi desenvolvida como resultado de uma parceria prévia entre a UnB e a Embrapa Agroenergia (CARVALHO, 2018).

O meio de cultura basal utilizado para produção de enzimas pelos fungos selecionados seguiu a composição descrita por Mandels & Weber (1969), uma das mais utilizadas para produção de celulases por fungos filamentosos (CHANDEL et al., 2012) (Tabela 4). Para o preparo do meio de produção de enzimas os seguintes componentes foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 250 mL: 1 g de bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise (seco e moído), 250 mg de farelo de trigo utilizado na indústria de rações (Bunge Alimentos S/A), e 50 mL de meio de Mandels e Weber (1969) (Tabela 4). A suplementação com farelo de trigo foi realizada devido ao fato desse substrato rico em nutrientes ser amplamente utilizado para favorecer a produção de hidrolases por uma ampla gama de fungos filamentosos (CAMASSOLA & DILLON, 2007). Após a esterilização, cada frasco foi inoculado com 5 discos de 8 mm de diâmetro contendo micélio dos fungos cultivados previamente em BDA conforme descrito anteriormente.

Tabela 4. Meio de cultura de Mandels & Weber (1969) utilizado para produção de enzimas pelos fungos selecionados no presente trabalho.

Concentração	Componentes
0,3 g/L	Uréia
1,4 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄
2 g/L	K ₂ HPO ₄
0,4 g/L	CaCl ₂ .2H ₂ O
0,3 g/L	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,75 g/L	Peptona bacteriológica
0,25 g/L	Extrato de levedura
5 mg/L	FeSO ₄ .7H ₂ O
1,04 mg/L	MnSO ₄ .7H ₂ O
2 mg/L	CoCl ₂ .6H ₂ O
0,1%	Tween 80

Os frascos foram incubados por 7 dias, a 28°C e 180 rpm. Após o cultivo, o sobrenadante (secretoma) foi coletado e transferido para tubos de 50 mL. Esses tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 30 min a 4°C. Essa etapa foi repetida para obtenção de sobrenadante limpo, sem restos celulares; azida sódica foi adicionada (0,02%) e as amostras foram mantidas refrigeradas até a avaliação enzimática. O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado com 3 repetições.

Determinação de proteína total dos extratos enzimáticos

A determinação de proteínas totais presentes nos sobrenadantes (secretomas) foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (SMITH et al., 2014), de acordo com o manual do fabricante (Thermo Scientific – Pierce ® BCA Protein Assay Kit). As quantificações

foram feitas adicionando 25 μL de cada amostra de sobrenadante a 200 μL do reagente BCA (Bicinchoninic acid kit for protein determination, Sigma-Aldrich). A mistura foi incubada a 37°C em estufa por 30 min, em seguida a leitura em comprimento de onda 562 nm foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA). Para conversão dos valores de absorbância para valores de massa foi construída uma curva padrão com solução de BSA (albumina sérica bovina; 2 mg/mL), variando a concentração de proteína entre 0,05-2 mg/mL. Cada análise foi realizada em triplicata.

Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram determinadas utilizando microplacas. Os ensaios foram realizados em termociclador em microplacas de 96 poços a 50°C e pH 5,0 (tampão citrato de sódio-ácido cítrico 0,1 M). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de equivalentes a glicose ou xilose por minuto, nas condições de ensaio. Foram calculadas também a atividade específica, que consiste no número de unidades de atividade por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

a) Determinação do potencial de sacarificação do extrato enzimático (FPase):

Para determinar o potencial de sacarificação do extrato enzimático foi utilizado ensaio de FPase em microplacas (em triplicata). Como substrato foram utilizados discos de 7 mm do papel filtro Whatman n°1 (GE Healthcare, UK) (XIAO et al., 2004). Foi obtida a curva padrão de glicose, usando-se uma solução de glicose a 10 mg/mL. Este ensaio corresponde ao método de FPase (GHOSE, 1987), o qual foi adaptado por XIAO et al. (2004) para realização em microplacas e apresenta boa correlação com a metodologia original.

Os controles foram feitos em triplicata para o branco da enzima (sem substrato), branco do substrato (sem enzima) e para cada amostra. Em cada poço foram adicionados 40 μL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 mol/L pH 5,0, um disco de papel filtro tipo Whatman® e 20 μL do extrato enzimático. Na reação controle (branco da enzima) foram adicionados em cada poço 40 μL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1mol/L pH 5,0 e 20 μL da enzima. E na reação controle (branco do substrato) foram adicionados 60 μL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1mol/L pH 5,0 e um disco de papel filtro. Após incubação por 60 min a 50 °C, 120 μL de solução de ácido 3,5 - dinitro - salicílico (DNS) (MILLER, 1959) foram adicionados e a mistura foi novamente incubada por 10 min a 97°C.

Para determinar a absorbância, 36 μL foram retirados de cada um dos poços e transferidos para uma microplaca de Elisa contendo 160 μL de água destilada em cada poço.

A leitura da absorbância foi feita em 540 nm (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA). A atividade enzimática foi expressa em U/mL, sendo definida como a quantidade de açúcares redutores liberada na unidade de tempo por mililitro de extrato (μmol de açúcar redutor/min/mL).

b) β -glicosidase:

A determinação de β -glicosidase em D-celobiose foi realizada em microplacas de PCR (triplicata). No ensaio foi preparada uma solução de D-celobiose (Sigma-Aldrich) a 15 mM em tampão citrato/ácido cítrico 0,1M pH 5,0. Foi feita uma curva padrão de glicose, utilizando-se uma solução de glicose a 5 mg/mL (GHOSE, 1987). Aos poços correspondentes ao branco da enzima foram adicionados 100 μL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1M pH 5,0 e 100 μL do extrato e aos poços correspondentes ao branco do substrato adicionou-se 100 μL tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 e 100 μL da solução celobiose 15 mM (substrato). Ao poço correspondente ao branco do aparelho (solução utilizada para zerar a leitura da Absorbância) foram adicionados 200 μL de tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0. Para os ensaios de atividade enzimática, foram adicionados 100 μL de solução celobiose e 100 μL do extrato enzimático. A reação foi colocada em termociclador e incubada a 50°C por 30 min com uma etapa adicional de 95°C por 10 min para inativação das enzimas.

Para detecção da glicose gerada, 2,5 μL de cada uma das amostras contidas nos poços da placa de PCR foram transferidos para uma placa de ELISA. Em seguida, 250 μL do reagente glicose oxidase (Bioclin) foram adicionados e a placa foi incubada em espectrofotômetro (SpectraMax Plus384, Molecular Devices) a 37°C por 10 min. A absorbância foi determinada a 505 nm. A curva padrão de glicose foi composta de quatro pontos, preparada com diluições da solução padrão de glicose a 5 mg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado utilizando o valor obtido da absorbância da amostra, descontado do valor da absorbância do branco da enzima e do branco do substrato. Como resultado obtido, calculou-se a concentração de glicose gerada a partir da equação obtida com a curva padrão. A atividade enzimática foi expressa em U/mL, sendo definida como a quantidade de glicose liberada na unidade de tempo por mililitro de extrato (μmol de glicose/min/mL).

c) Xilanase

A quantificação de xilanase foi realizada em placa de PCR (96 poços) utilizando 10 μL de solução de xilana de faia 1% - Sigma Aldrich (substrato) com 10 μL de extrato enzimático.

Ao branco da enzima foram adicionados 10 µL de tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 e 10 µL do extrato enzimático. Ao branco do substrato adicionou-se 10 µL tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 e 10 µL de solução de xilana 1%. Em termociclador, a placa de PCR foi incubada a 50°C por 30 min. No intervalo da incubação, foi preparada uma solução padrão de xilose 5 mg/mL para o preparo da curva padrão.

Após a incubação, foram adicionados 30 µL de solução de DNS (ácido dinitrosalicílico) e novamente a placa foi vedada e incubada em termociclador, desta vez, a 95°C durante 10 min. Em uma placa de Elisa foram adicionados 160 µL de água destilada a cada um dos poços e após homogeneizar com pipeta multicanal, todo o conteúdo da placa de PCR foi transferido. A absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro.

Uma unidade de xilanase (UI.mL⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o substrato para gerar 1 µmol de xilose por minuto. Foi descontado o valor da absorbância do branco da enzima e do branco do substrato. Com o resultado obtido, calculou-se a concentração de xilose gerada a partir da equação obtida com a curva padrão, com as diluições realizadas.

d) Endoglicanase

Realizada conforme descrito no item 3.2.3.2.2 c (xilanase), o substrato nesta reação é CMC (carboximetilcelulose) e a curva de padrão foi preparada com solução de glicose 5 mg/mL.

Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise

Empregando extrato enzimático dos fungos selecionados, foi realizada a hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado por autohidrólise (descrito anteriormente). A hidrólise foi feita em placas “DeepWell” de 24 poços (Axygen Biosciences, Hangzhou, China).

A hidrólise enzimática foi realizada com teor de sólidos de 5 % (m/v). Em cada um dos poços, foram colocados 0,7 g de biomassa pré-tratada (73% de umidade), volume de extrato enzimático (2,5 mL, ~50% do volume total) e solução tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 em um volume final de 4 mL. A hidrólise foi realizada em triplicata. As placas foram imediatamente vedadas com filme plástico e incubadas em um agitador orbital sob agitação constante de 200 rpm, a 50°C, durante 24 horas. O hidrolisado foi coletado e em seguida centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e depois avaliado para determinação da quantidade de glicose, xilose e celobiose, utilizando HPLC-RID.

Com base nos resultados deste experimento, uma cepa foi selecionada para continuidade da avaliação enzimática.

3.2.3.3. Caracterização enzimática e desempenho de hidrólise do extrato enzimático (secretoma) produzido por *Talaromyces amestolkiae* CP-230 após cultivo em dois tipos de bagaço de cana pré-tratado

Com base no desempenho de hidrólise do bagaço tratado por tratamento hidrotérmico nos testes anteriores, uma cepa foi selecionada (*T. amestolkiae* CP-230). Para melhor caracterização enzimática dessa cepa e para definir qual tipo de bagaço pré-tratado é mais adequado para indução da produção de enzimas, um novo cultivo foi realizado para obtenção de extratos enzimáticos. Dessa vez, o cultivo foi realizado utilizando duas biomassas pré-tratadas distintas como fonte indutora no mesmo meio de cultivo descrito anteriormente: bagaço pré-tratado por autohidrólise (seco e triturado) e bagaço pré-tratado por método organosolv (seco e triturado; obtido da seguinte forma: pré-tratado em solução etanol e água, teor de sólidos na proporção sólido:líquido de 1:6 (m/v) a 180 ° C por 2 horas). Estes dois extratos enzimáticos (secretomas) foram denominados CP230-H e CP230-O, respectivamente, e foram submetidos à dosagem de atividades enzimáticas (descritas anteriormente) e aplicados na hidrólise dessas mesmas biomassas pré-tratadas.

O experimento de hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas por autohidrólise e organosolv foi realizado com 3 repetições em placas “Deep Well”, com 5% (m/v) de biomassa pré-tratada, em tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 M pH 5,0. Nesta etapa, a enzima foi dosada por FPU/g de biomassa (base seca), para melhor comparação entre os extratos obtidos. A dosagem utilizada foi de 3,3 FPU/g de biomassa (padronização feita pela menor atividade FPase, apresentada pelo extrato CP230-O). Além dos extratos enzimáticos obtidos pelo cultivo de *T. amestolkiae* CP-230, o coquetel enzimático comercial Cellic CTec3 (220 FPU/ mL, padrão de comparação) foi incluído nos experimentos, na mesma dosagem de 3,3 FPU/g de biomassa.

Após a hidrólise, a fração líquida foi recuperada e as concentrações de glicose, xilose e celobiose determinadas por HPLC-RID (Aminex HPX-87H). Foi utilizado teste t de Student ($\alpha=0.05$) para avaliar se houve diferença significativa entre as médias dos teores de glicose presentes no hidrolisado. Além dos valores de concentração dos açúcares, também foi calculada a conversão da celulose em glicose (concentração de glicose obtida na hidrólise enzimática/glicose máxima teórica, calculada com base no teor de glicana da biomassa).

Para determinação do teor de celulose, hemicelulose e lignina das biomassas utilizadas foi realizada a sua caracterização química. Para tanto, foi utilizada metodologia de ensaio adaptada de Gouveia et al. (2009). As amostras de 1 grama de bagaço pré-tratado (moído a 20

mesh em moinho Wiley) foram transferidas para tubos de 25 mL e tratadas com 5 mL de H₂SO₄ 72% (v/v), sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a 45°C por 7 min.

As amostras foram transferidas para frascos erlenmeyers de 250 mL, adicionando-se o volume de 125 mL de água. Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 250 mL, o qual teve o seu volume completado com água destilada; a fração sólida foi lavada com água destilada; esta solução foi utilizada para análises de carboidratos. A quantificação dos carboidratos foi feita por cromatografia líquida (HPLC/RID), utilizando coluna Aminex HPX-87H (BioRad) aquecida a 45°C, fase móvel constituída de uma solução de H₂SO₄ 0,005 M com vazão de 0,6 mL/min e detector RID a 40°C.

Para determinação da lignina insolúvel, o papel filtro contendo a fração sólida foi lavado com 2000 mL de água destilada e foi seco em estufa a 100°C, até atingir massa constante. Desse modo, considerou-se a massa seca retida no papel filtro como lignina.

Para determinar os polissacarídeos foram calculados os teores de celulose e hemicelulose, utilizando os seguintes fatores de conversão: celulose = 0,90 x Glicose (g) + 0,95 x celobiose (g) + 1,2 x HMF (g) + 3,09 x ácido fórmico (g) e hemicelulose = 0,88 x xilose (g) + 0,88 x arabinose (g) + 0,72 x ácido acético (g) + 1,37 x furfural (g). A composição dos materiais lignocelulósicos utilizados no presente trabalho é mostrada no quadro abaixo.

Bagaço de cana (pré-tratamento hidrotérmico)		
%	Média	Desvio
Celulose	48,41	2,16
Hemicelulose	1,42	0,16
Lignina	40,69	0,78
Bagaço de cana (pré-tratamento organosolv)		
Média	Média	Desvio
Celulose	52,39	1,72
Hemicelulose	11,22	0,36
Lignina	18,81	0,58

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Classificação taxonômica de uma coleção de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* por meio de análise de sequência da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico

Neste trabalho, uma coleção de 291 fungos endofíticos de plantas da Amazônia e de manguezal foi avaliada quanto à viabilidade e pureza e foi caracterizada por métodos moleculares (análise de genes marcadores taxonômicos).

Os resultados mostraram produtos de amplificação únicos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, com tamanho de aproximadamente 600 pb, os quais foram obtidos com sucesso para as 291 cepas avaliadas. A Figura 10 representa o perfil de amplificação obtido para alguns fungos utilizando os primers ITS1-F e ITS4.

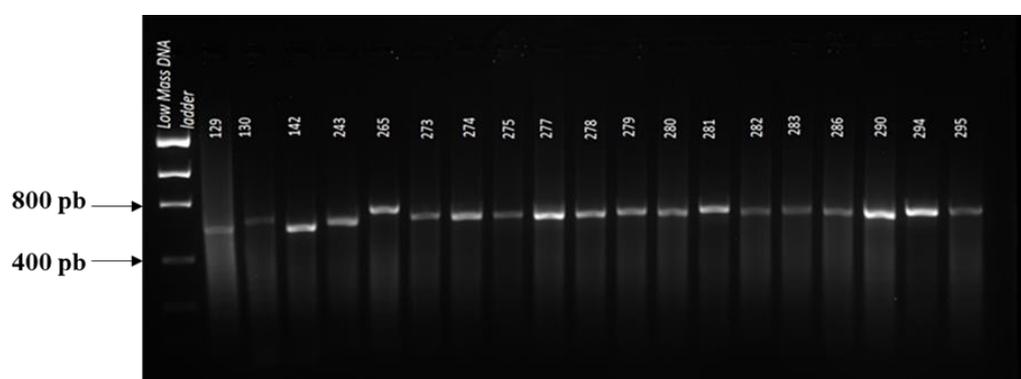


Figura 10. Produtos de amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle*. A primeira canaleta à esquerda representa o marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). A numeração correspondente às seguintes cepas: 129 (EP 565), 130 (EP 613), 142 (EP 608), 243(31G), 265 (RZ487*), 273 (RZ 464), 274 (CED 433/1 A), 275 (RZ 491), 277 (CED 389B), 278 (CE 93*), 279 (EP558), 280 (CE 101 OU 161*), 281 (EP 541), 282 (EP 600*), 283(RZ 491 NOVO), 286 (RZ 521), 290 (CE 101), 294 (EP 593), 295 (EP 596). Os asteriscos são denominações que vieram nos códigos das cepas, não representam nenhum significado.

Ao todo, das 291 cepas sequenciadas, 218 apresentaram sequências da região ITS com qualidade suficiente para análise, com tamanho de no mínimo 400 pb. Os resultados mostraram que, das 218 cepas que puderam ser classificadas, 4 pertencem ao filo Basidiomycota (Classe Agaricomycetes) e 214 ao filo Ascomycota. Entre os ascomicetos, 163 pertencem à classe *Sordariomycetes*, 40 à classe *Eurotiomycetes* e 11 à classe *Dothideomycetes*. Das 218 cepas, 5 não corresponderam a nenhum gênero fúngico conhecido depositado nos bancos de dados avaliados. Em função disso, esses fungos foram classificados de acordo com a maior identidade com sequências dos bancos de dados utilizados. Por exemplo, 3 basidiomicetos foram classificados como pertencentes a ordem *Agaricales*; 1

ascomiceto como pertencente a ordem *Xylariales*; e 1 ascomiceto pertencente a classe *Eurotiomycetes*, conforme mostrado no Anexo 1.

Ao todo foi possível distinguir 23 gêneros diferentes, sendo que os mais frequentes foram *Clonostachys*, *Diaporthe*, *Fusarium* e *Trichoderma*. Especificamente, os 23 gêneros identificados pela análise da região ITS do rDNA e sua frequência foram: 3 *Annulohyphoxylon*, 13 *Aspergillus*, 49 *Clonostachys*, 1 *Colletotrichum*, 1 *Cordyceps*, 40 *Diaporthe*, 2 *Dokmaia*, 1 *Eutypa*, 38 *Fusarium*, 2 *Lasiodiplodia*, 5 *Neofusicoccum*, 2 *Neopestalotiopsis*, 1 *Neurospora*, 1 *Ophiocordyceps*, 3 *Paecilomyces*, 2 *Paraconiothyrium*, 11 *Penicillium*, 1 *Phialemonium*, 1 *Sarocladium*, 12 *Talaromyces*, 1 *Trametes*, 22 *Trichoderma* e 1 *Xylaria* (Anexo 1).

Com relação à espécie vegetal de origem dos fungos, observou-se que os gêneros *Colletotrichum*, *Neurospora*, *Sarocladium*, *Trametes* e *Xylaria* foram identificados apenas entre os 35 fungos endofíticos de mangue-vermelho (*R. mangle*). Enquanto que *Annulohyphoxylon*, *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Cordyceps*, *Dokmaia*, *Eutypa*, *Lasiodiplodia*, *Neopestalotiopsis*, *Ophiocordyceps*, *Paecilomyces*, *Paraconiothyrium*, *Phialemonium* e *Talaromyces* foram identificados entre as 256 cepas oriundas do guaranazeiro (*P. cupana*).

Para alguns grupos de taxonomia complexa (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Diaporthe*) é necessário avaliar outros genes além da região ITS, para classificação ao nível de espécie, o que também é denominado como análise multilocus (CHAVERRI et al., 2015). Devido a isso, optou-se por apresentar os dados de classificação ao nível de gênero para as 218 cepas que tiveram sequências de boa qualidade. Ainda assim, conforme mostrado no Anexo 1, algumas cepas foram apresentadas com identificação ao nível de espécie quando alcançaram 100% de identidade com sequências de ITS de *type strains* em mais de uma base de dados utilizada. Futuramente, análises filogenéticas deverão ser realizadas para cada gênero identificado, em comparação com sequências de linhagens tipo das espécies que compõem o gênero.

Poucos trabalhos têm sido realizados para avaliara diversidade de fungos endofíticos associados ao guaranazeiro (SIA et al., 2013; BATISTA et al., 2017; SILVA et al., 2018). Fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum* estão entre os mais estudados, pois causam doenças de impacto econômico para a cultura (BONATELLI et al., 2016). Alguns estudos identificaram fungos endofíticos de guaranazeiro da Amazônia capazes de produzir metabólitos bioativos (ELIAS, 2015; SILVA et al., 2018; ELIAS et al., 2018). De forma semelhante ao observado neste trabalho, os autores relataram a identificação de *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichodermae* *Xylaria*, entre outros, como parte da microbiota endofítica desta planta. Os resultados do

presente trabalho ampliam o conhecimento do inventário de gêneros até então descritos em associação endofítica com as folhas, ramos, frutos, sementes e raízes de *P. cupana*. Isso é exemplificado pela descoberta de que *Annulohyphoxylon*, *Cordyceps*, *Dokmaia*, *Eutypa*, *Lasiodiplodia*, *Neopestalotiopsis*, *Ophiocordyceps*, *Paraconiothyrium* e *Phialemonium* compõem a comunidade microbiana endofítica desta planta típica da Amazônia.

Plantas de manguezal são colonizadas por uma ampla diversidade de fungos endofíticos, apesar de seu habitat extremo em termos de salinidade, pH, e influência de marés (LI et al., 2016). Em relação aos fungos endofíticos de mangue-vermelho (*R. mangle*), podem ser citados os trabalhos de SEBASTIANES (2010) e de COSTA et al. (2012). Assim como observado nos resultados, esses autores relataram que essa planta é comumente colonizada por *Diaporthe*, *Neofusicoccum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Colletorichum*, *Xylaria*, *Neurospora*, entre outros. Embora um menor número de cepas tenha sido avaliado neste trabalho em comparação com outros relatos sobre fungos endofíticos de *R. mangle*, espécies de *Sarocladium* e de *Trametes* são descritas pela primeira vez como componentes da comunidade de fungos dessa planta típica de manguezal.

Os resultados obtidos contribuíram para o avanço do conhecimento da diversidade de fungos associados à *P. cupana* e *R. mangle* em seus ambientes naturais. Além disso, os resultados foram úteis para enriquecer os bancos de germoplasma de microrganismos da Embrapa, em especial a “*Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicadas a Agroenergia e Biorrefinarias*”, a qual mantém as cepas deste estudo. Uma vez purificadas e identificadas, os 291 fungos foram caracterizados quanto à capacidade de produzir enzimas para despolimerização de polissacarídeos, conforme descrito adiante.

3.3.2. Capacidade de degradação de polissacarídeos em meio de cultura sólido de 291 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* e seleção de cepas produtoras de enzimas

A caracterização enzimática de 291 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* foi realizada como parte de uma estratégia para seleção de cepas promissoras quanto à degradação de polissacarídeos. Essa triagem primária teve como foco a determinação do índice enzimático e do perfil de degradação dos polissacarídeos carboximetilcelulose (CMC), amido, xilana e pectina, sendo que a capacidade de crescimento em celulose microcristalina também foi investigada. A prospecção de fungos produtores de enzimas por meio de testes em meio sólido é uma estratégia simples e rápida para análise de um grande número de cepas (POINTING, 1999). A produção de zonas de clareamento do substrato ao redor da colônia indica a despolimerização dos polissacarídeos pelas enzimas secretadas (ZHANG et al., 2006;

HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

Os resultados da determinação do índice enzimático em 5 substratos diferentes, bem como da capacidade de crescimento em celulose microcristalina dos 291 fungos são mostrados no Anexo 1.

Com relação à determinação do índice enzimático em diferentes substratos verificou-se que mais de 80% das linhagens avaliadas foram capazes de degradar pelo menos um dos polissacarídeos avaliados (carboximetilcelulose, xilana, pectina em pH 5, pectina em pH 7 e amido) (Figura 11). Essa degradação foi evidenciada por valores de índice enzimático maiores que 1, o que é indicativo de secreção de endoglicanase, xilanase, poligalacturonase, pectina liase e amilase, respectivamente (Figura 11). Ao todo, de 291 linhagens, 87,97% produziram endoglicanase, 91,75% produziram xilanase, 91,06% produziram poligalacturonase, 93,81% produziram pectina liase e 85,22% produziram amilase. Apenas 7 (2,4%) cepas não cresceram em nenhum dos 5 meios de cultura utilizados (Anexo 1).

A análise estatística revelou diferenças significativas entre as cepas ($p < 0,01$) quanto à capacidade de produção de enzimas (Anexo 1). Os fungos que apresentaram valores de índice enzimático maiores que 1 em pelo menos 1 dos substratos puderam ser agrupados em classes fenotípicas, conforme o perfil de degradação de polissacarídeos (simultânea de 2 ou mais substratos, ou exclusiva de 1 dos polissacarídeos testados) (Anexo 1).

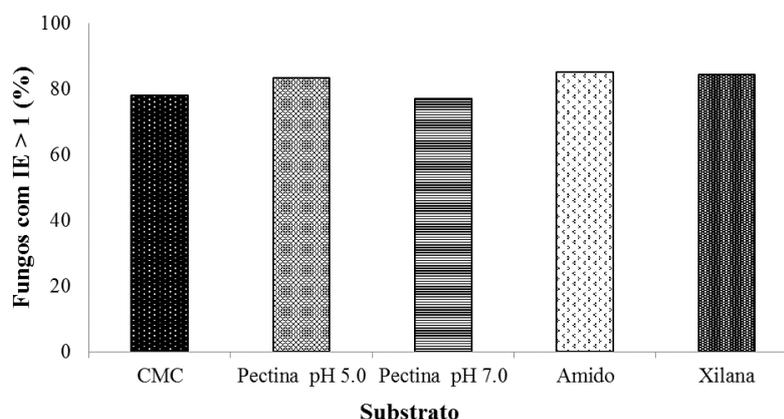


Figura 11. Porcentagem de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* (total de 291 linhagens) que apresentaram índice enzimático (IE) > 1 quando cultivados por 6 dias a 25°C em meio sólido contendo diferentes polissacarídeos como única fonte de carbono. Carboximetilcelulose (CMC), xilana, pectina (pH 5,0), pectina (pH 7,0) e amido são substratos utilizados para detecção preferencialmente de endoglicanase, xilanase, poligalacturonase, pectina liase e amilase, respectivamente.

Das 214 cepas produtoras de amilase (isto é, que apresentaram IE > 1 em amido), 4 delas apresentaram os maiores valores de IE (2,68 a 4,14) e foram identificadas como *Neopestalotiopsis*, *Neofusicoccum*, *Paraconiothyrium* e *Clonostachys*. Das 256 linhagens que

degradaram xilana, 18 delas (~7%) apresentaram os maiores valores de IE (2,96 a 5,26) e pertencem aos gêneros *Paraconiothyrium*, *Annulohyphoxylon*, *Neopestalotiopsis*, *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Talaromyces*, *Sarocladium*, *Neofusicoccum*, e *Diaporthe*. Em relação à produção de pectinases, das 252 cepas produtoras de poligalacturonase, 13 delas (~5%) apresentaram os maiores valores de IE (2,76 a 4,03), com destaque para cepas classificadas como *Neopestalotiopsis*, *Annulohyphoxylon*, *Diaporthe* e *Neofusicoccum*, entre outras cepas não identificadas. Já entre as 258 cepas produtoras de pectina liase, 16 delas (~6%) apresentaram os maiores IE (3,25 a 6,36) e foram classificadas como *Paraconiothyrium*, *Neopestalotiopsis*, *Aspergillus*, *Neofusicoccum*, *Agaricales*, *Clonostachys*, *Diaporthe*, *Phialemonium*, *Talaromyces*, *Xylariales* e *Cordyceps*.

Com relação à produção de celulasas (endoglicanase), das 237 cepas produtoras, 27 delas (~11%) apresentaram os maiores valores de IE (2,75 a 4,18) e foram classificadas como *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Neofusicoccum*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Clonostachys*, e outras cepas não identificadas (Anexo 1).

Além da determinação do índice enzimático em meio contendo celulose solúvel (CMC), as 291 cepas também foram caracterizadas quanta à capacidade de crescer em celulose microcristalina como única fonte de carbono (substrato insolúvel). O crescimento nesse substrato indica a produção de celulasas totais. Das 291 cepas, apenas 3 não cresceram neste substrato (Tabela 5; Anexo 1), e para as cepas que cresceram, o diâmetro variou de 0,85 mm até 85 mm. Das 288 cepas que cresceram em Avicel, aproximadamente 14% apresentaram crescimento máximo (75 a 85 mm) nas condições avaliadas (Anexo 1; Tabela 5), indicando o potencial desses fungos para degradar materiais celulósicos.

A análise estatística dos dados de crescimento em Avicel também revelou diferenças significativas entre as linhagens (Anexo 1). De modo geral, a maioria das linhagens classificadas como *Neofusicoccum* e *Trichoderma* apresentou crescimento superior na celulose microcristalina (> 75 mm), juntamente com alguns representantes de *Annulohyphoxylon*, *Clonostachys*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Paecilomyces* *Penicillium* (Tabela 5). Também foi possível observar que, salvo algumas exceções, a maioria das cepas de *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus* e *Clonostachys* apresentou menor crescimento em celulose microcristalina (Anexo 1). Também foi observado que as linhagens com maior capacidade de crescimento em Avicel não foram as mesmas que apresentaram os maiores valores de índice enzimático em meio contendo CMC (Anexo 1). Isso revela a importância de avaliar estes dois tipos de celulose (solúvel e insolúvel) em programas de bioprospecção de fungos celulolíticos.

Tabela 5. Diâmetro de crescimento de 291 linhagens de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* em meio contendo celulose microcristalina (Avicel PH-101) como única fonte de carbono, após 4 dias de crescimento a 25°C. *Teste de Scott-knott a 5% ($p=0,005$, 95%) de nível de significância.

Crescimento (mm)	Número de linhagens	Classificação taxonômica
0,00	3	<i>Diaporthe, Agaricales</i>
0,85 a 9,95	25	<i>Clonostachys, Diaporthe, Fusarium, Xylariales, Phialemonium, Talaromyces, Trametes, Trichoderma, Xylaria</i>
10,21 a 29,97	73	<i>Annulohyphoxylon, Aspergillus, Clonostachys, Diaporthe, Dokmaia, Eutypa, Fusarium, Paecilomyces, Paraconiothyrium, Penicillium, Talaromyces, Lasiodiplodia</i>
30,08 a 49,70	96	<i>Annulohyphoxylon, Aspergillus, Clonostachys, Cordyceps, Diaporthe, Dokmaia, Fusarium, Ophiocordyceps, Paecilomyces, Penicillium, Talaromyces, Trichoderma</i>
50,71 a 69,90	47	<i>Fusarium, Neopestalotiopsis, Penicillium, Colletotrichum, Agaricales, Aspergillus</i>
70,43 a 85,00	47	<i>Annulohyphoxylon, Clonostachys, Lasiodiplodia, Diaporthe, Fusarium, Neofusicoccum, Neurospora, Penicillium, Trichoderma, Paecilomyces</i>

Com base nos resultados de índice enzimático, de crescimento em celulose microcristalina e de identificação taxonômica foram selecionadas 27 cepas para uma segunda etapa de triagem, com foco na produção de celulases e hemicelulases em cultivo em fermentação submersa e análise de desempenho de extratos enzimáticos (secretoma) na hidrólise de biomassa lignocelulósica. Embora tenha sido dada preferência para as linhagens com valores elevados de IE e de crescimento em celulose microcristalina, algumas linhagens com valores medianos foram também selecionadas por apresentarem um perfil de degradação completo, ou seja, foram capazes de degradar todos os polissacarídeos avaliados. Das 27 cepas selecionadas, 5 são de *R. mangle* e 22 de *P. cupana*.

As Figuras 12 e 13 resumem graficamente (*heatmap*) os dados de IE e de crescimento em celulose microcristalina, respectivamente, obtidos para as 27 cepas selecionadas para continuidade da bioprospecção (aproximadamente 10% do total de cepas). Para uma melhor identificação das 27 cepas selecionadas, outros genes marcadores taxonômicos foram sequenciados e avaliados. Os resultados da análise do gene $EF1\alpha$ contra diferentes bases de dados são apresentados no Anexo 2. As Figuras 12 e 13 mostram a classificação das cepas selecionadas com base nesses genes e no ITS rDNA, quando possível ao nível de espécie.

Neste trabalho foi realizada pela primeira vez uma ampla caracterização do perfil de degradação de polissacarídeos de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle*, com uma triagem primária para selecionar linhagens para sacarificação de biomassa lignocelulósica. Como citado anteriormente, fungos endofíticos dessas plantas têm sido investigados quanto à produção de metabólitos bioativos.

O único trabalho que relata algum tipo de caracterização enzimática de fungos endofíticos de *P. cupana* é o de SILVA et al. (2018). Estes autores isolaram 37 cepas de *P. cupana* da Amazônia e avaliaram a produção de amilase e celulase usando testes qualitativos. A presença ou ausência de halo de degradação do substrato foi avaliada. Amilase foi produzida por espécies dos gêneros *Pestalotiopsis*, *Diaporthe*, *Mycoleptodiscus*, *Fusarium*, *Mycena*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Celulase foi detectada para espécies dos gêneros *Diaporthe*, *Pestalotiopsis*, *Fomitopsis*, *Mycoleptodiscus*, *Paecilomyces*, *Arxiella*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Colletotrichum* e *Xylogone*. Alguns desses gêneros também produziram amilases e celulases em condições semelhantes no presente trabalho (Anexo 1).

Identificação	Linhagens	Endoglicanase (CMCase)	Xilanase	Poligalacturonase	Pectina liase	Amilase	Índice Enzimático
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CP230*						6
<i>Neofusicoccum ribis</i>	2G#						5
<i>Diaporthe</i>	CED371*						4
<i>Paraconiothyrium</i>	CE101/161*						3
<i>Paraconiothyrium</i>	CE101*						2
<i>Neopestalotiopsis</i>	CED409*						1
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	EP551/1*						
<i>Aspergillus pseudonomius</i>	EP593*						
<i>Trichoderma</i>	CE103*						
<i>Neopestalotiopsis</i>	CED334*						
<i>Neofusicoccum ribis</i>	12G#						
<i>Neofusicoccum</i>	BDA64 (9A)#						
<i>Neofusicoccum</i>	BDA6A (2A)#						
<i>Diaporthe</i>	BDA79(11A)#						
<i>Clonostachys rosea</i>	CED342*						
<i>Diaporthe</i>	CED382*						
<i>Diaporthe citri</i>	CED385*						
<i>Diaporthe</i>	CED413*						
<i>Diaporthe</i>	CED414*						
<i>Diaporthe</i>	CED432*						
<i>Clonostachys rosea</i>	CP256*						
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	EP555*						
Agaricales	EP595*						
<i>Neofusicoccum</i>	EP650*						
<i>Clonostachys</i>	EP652*						
<i>Penicillium</i>	RZ478*						
<i>Fusarium solani</i>	RZ482*						

Figura 12. Representação gráfica (*heatmap*) dos valores de índice enzimático (médias) de 27 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* selecionados para continuidade da bioprospecção visando à seleção de cepas produtoras de extrato enzimático eficiente para hidrólise de biomassa lignocelulósica. A classificação apresentada foi baseada na análise dos genes ITS1-5,8S-ITS2, EF1 α e actina contra diferentes bases de dados. #Fungos de *R. mangle*; *Fungos de *P. cupana*.

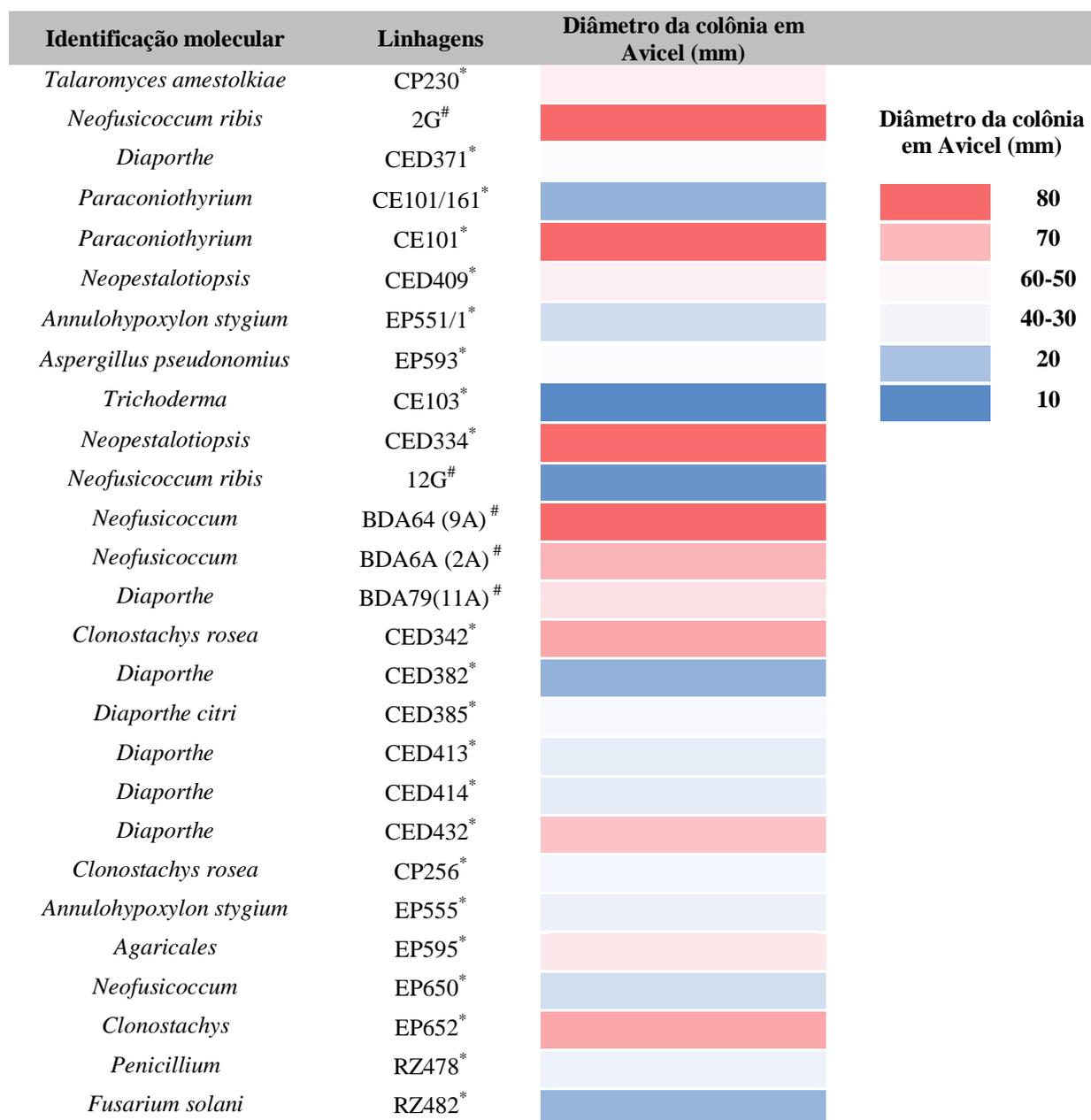


Figura 13. Representação gráfica (heatmap) dos valores médios de diâmetro (mm) das colônias após crescimento em meio mínimo contendo Avicel PH-101 como única fonte de carbono de 27 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* selecionados para continuidade da bioprospecção visando à seleção de cepas produtoras de extrato enzimático eficiente para hidrólise de biomassa lignocelulósica. O experimento foi realizado em triplicata e os fungos foram incubados por 4 dias a 25°C. A classificação apresentada foi baseada na análise dos genes ITS1-5,8S-ITS2, EF1 α e actina contra diferentes bases de dados. #Fungos de *R. mangle*; *Fungos de *P. cupana*.

Em relação aos fungos endofíticos de *R. mangle*, pode ser citado o trabalho de MAROLDI et al. (2018). Os autores avaliaram uma coleção de 41 fungos endofíticos de diferentes plantas de manguezal, entre elas *R. mangle*, quanto à capacidade de produção de celulases. A triagem inicial foi feita exclusivamente em meio mínimo sólido contendo Avicel como fonte de carbono. Todos os 11 fungos endofíticos de *R. mangle* avaliados (1 linhagem

de *Aspergillus*, 2 de *Diaporthe*, 1 de *Fusarium*, 4 de *Trichoderma*, 1 de *Penicillium* e 2 de *Xylaria*) foram capazes de crescer em celulose microcristalina, revelando sua capacidade de degradar materiais celulósicos. A análise foi do tipo presença ou ausência de crescimento após 7 dias, não sendo possível separar as cepas de crescimento lento ou vigoroso. No presente trabalho, o crescimento em Avicel foi verificado para todas as 35 linhagens endofíticas de *R. mangle*, sendo que o maior crescimento (> 75 mm) foi observado para cepas de *Neofusicoccum* e de *Trichoderma* provenientes dessa planta (Anexo 1).

Quanto à produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos, as linhagens que apresentaram os maiores crescimentos em Avicel e os maiores índices enzimáticos em outros polissacarídeos pertencem à grupos taxonômicos que não têm sido tradicionalmente utilizados para produção de enzimas industriais, tais como *Neofusicoccum*, *Paraconiothyrium*, *Diaporthe*, *Talaromyces*, *Neopestalotiopsis*, *Clonostachys*, *Annulohypoxylon*. Esses fungos estão entre os 27 selecionados e sua capacidade de produção de enzimas bem como o desempenho de hidrólise de seus extratos enzimáticos são detalhados a seguir.

3.3.3. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por 27 fungos endofíticos em cultivo submerso com bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise como fonte de carbono

A pesquisa envolvendo prospecção de novos microrganismos produtores de enzimas continua a identificar oportunidades para aumentar o desempenho de preparações enzimáticas por meio da suplementação com enzimas provenientes da biodiversidade (BERRIN et al., 2012).

Nesse contexto, a associação de análise de desempenho na hidrólise às etapas de triagem tem um papel importante na busca por fungos produtores de extratos enzimáticos (secretomas) eficientes para sacarificação. As 27 linhagens previamente selecionadas foram cultivadas em fermentação submersa em condições não otimizadas, utilizando essa mesma biomassa como fonte de carbono (bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise), além de farelo de trigo e meio de sais de MANDELS & WEBER (1969). O extrato enzimático da linhagem hiperceulolítica de referência *T. reesei* Rut-C30 obtido nas mesmas condições foi incluído nas análises para comparação de atividade enzimática. A Figura 14 apresenta a morfologia de todas as 27 linhagens selecionadas para produção enzimática.

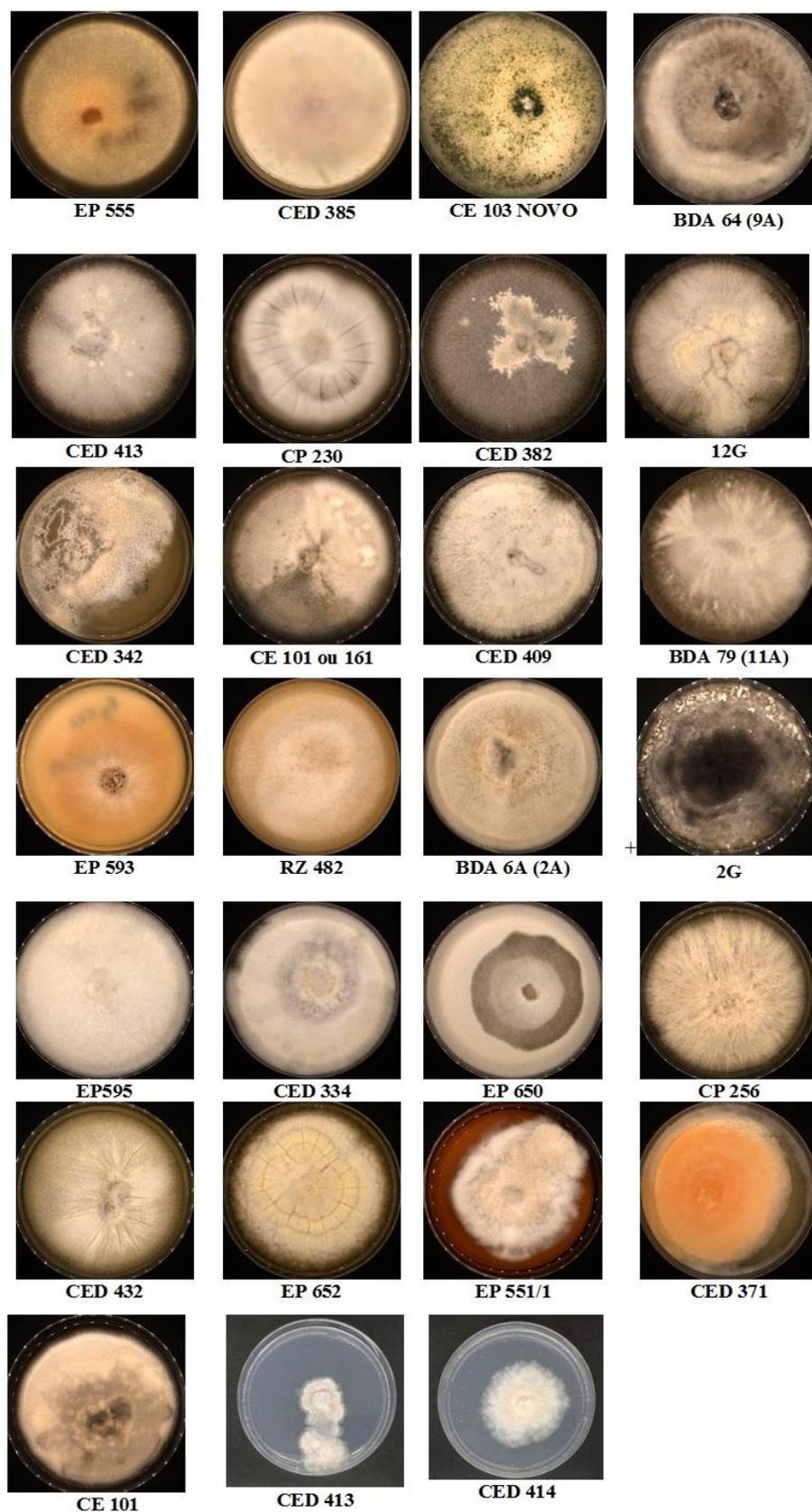


Figura 14. Fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* cultivados em meio de cultura Potato Glucose Agar durante 20 dias a 25°C, exceto as linhagens CED413 e CED414, cultivadas em PDA por 7 dias a 25°C. As linhagens estão identificadas com seus respectivos códigos.

O potencial de sacarificação dos 27 extratos fúngicos e do extrato controle foi determinado por meio da análise de FPase (não padronizada conforme Ghose, 1957). O secretoma com maior potencial de sacarificação foi o de *T. reesei* Rut-C30 (0,524 U/mL). Mesmo não sendo as condições ideais de indução dessa cepa mutante, o meio de Mandels & Weber foi desenvolvido originalmente para *T. reesei* e o bagaço pré-tratado por autohidrólise e farelo de trigo foram capazes de induzir a secreção de celulasas totais por esse fungo, nas condições utilizadas (Figura 15). Entre os 27 secretomas avaliados, os mais promissores quanto ao potencial de sacarificação (FPase) foram os dos fungos endofíticos do guaranzeiro. Por exemplo, *Neofusicoccum* sp. EP650 (0,322 U/mL) e *T. amestolkiae* CP230 (0,301 U/mL), seguidos de *Diaporthe* sp. CED385 (0,217 U/mL).

Das 27 linhagens avaliadas quanto a produção de β -glicosidase, verificou-se que 4 delas, bem como o controle, não produziram essa enzima (0,00 U/mL) (Figura 16). *T. reesei* Rut-C30 é reconhecido pela baixa capacidade de secreção de β -glicosidase. Os três melhores extratos quanto aos níveis de β -glicosidase foram os de *T. amestolkiae* CP230 (1,66 U/mL), *Annulohyphoxylon stygium* EP555 (1,66 U/mL) e *Neopestalotiopsis* sp. CED409 (1,58 U/mL), sendo que não houve diferença significativa entre esses extratos.

Quanto à produção de xilanases (Figura 17), a maior produção foi da cepa *Diaporthe* sp. CED382 (1,95 U/mL), seguida pela cepa *Diaporthe* sp. BDA79(11A) (1,71 U/mL), e pelas cepas *Neofusicoccum ribis* 12G (1,67 U/mL) e *Diaporthe* sp. CED371 (1,69 U/mL). Esses extratos foram significativamente superiores aos obtidos pela cepa controle *T. reesei* Rut-C30 (1,48 U/mL). Esses resultados mostram que essas linhagens podem ser candidatas para produção de xilanases a serem avaliadas em misturas enzimáticas para sacarificação de biomassa ou para outras aplicações.

Quanto à produção de endoglicanases (Figura 18), os valores de atividade alcançados pelo fungo endofítico de *R. mangle* *Diaporthe* sp. BDA79(11A) (4,98 U/mL) foram significativamente superiores aos do controle *T. reesei* Rut-C30 (3,70 U/mL), seguido de *Neofusicoccum* sp. BDA64(9A) (3,03 U/mL). A Figura 19 mostra os resultados de determinação do teor de proteínas nos extratos enzimáticos (secretomas).

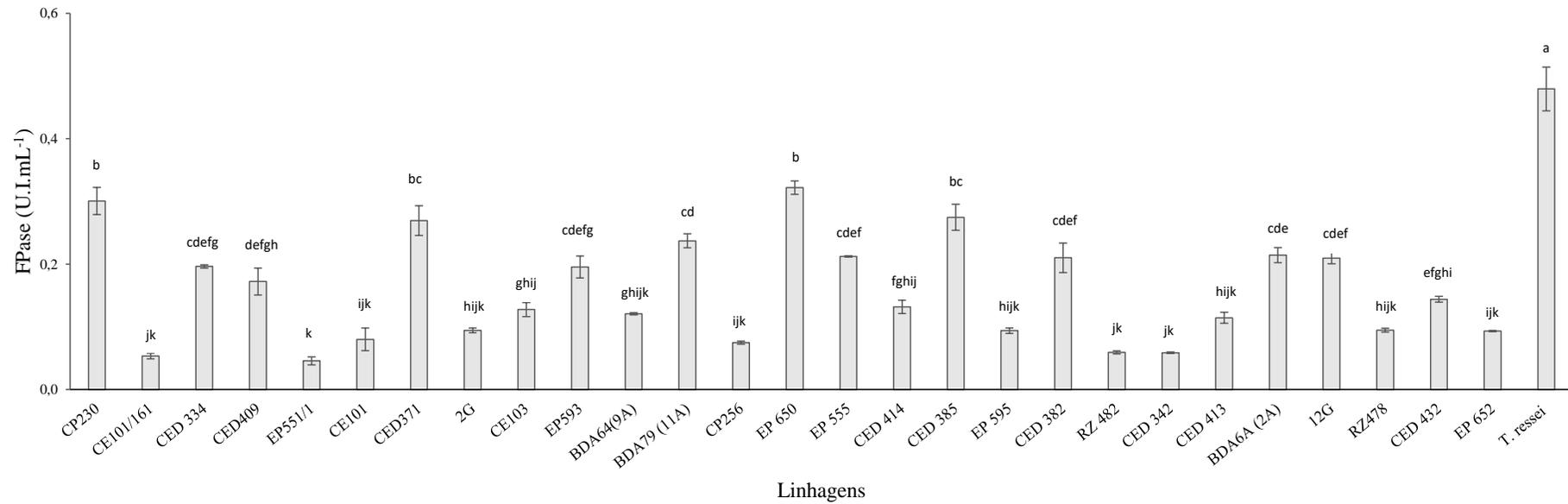


Figura 15. Valores de FPase do extrato enzimático bruto de 27 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* após 7 dias de cultivo em meio de Mandels e Weber suplementado com bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise e farelo de trigo. Os valores foram comparados com *T. reesei* Rut-C30. Os valores representam médias de três repetições. A última linhagem no gráfico é a cepa de referência hiperCelulolítica *T. reesei* Rut-C30.

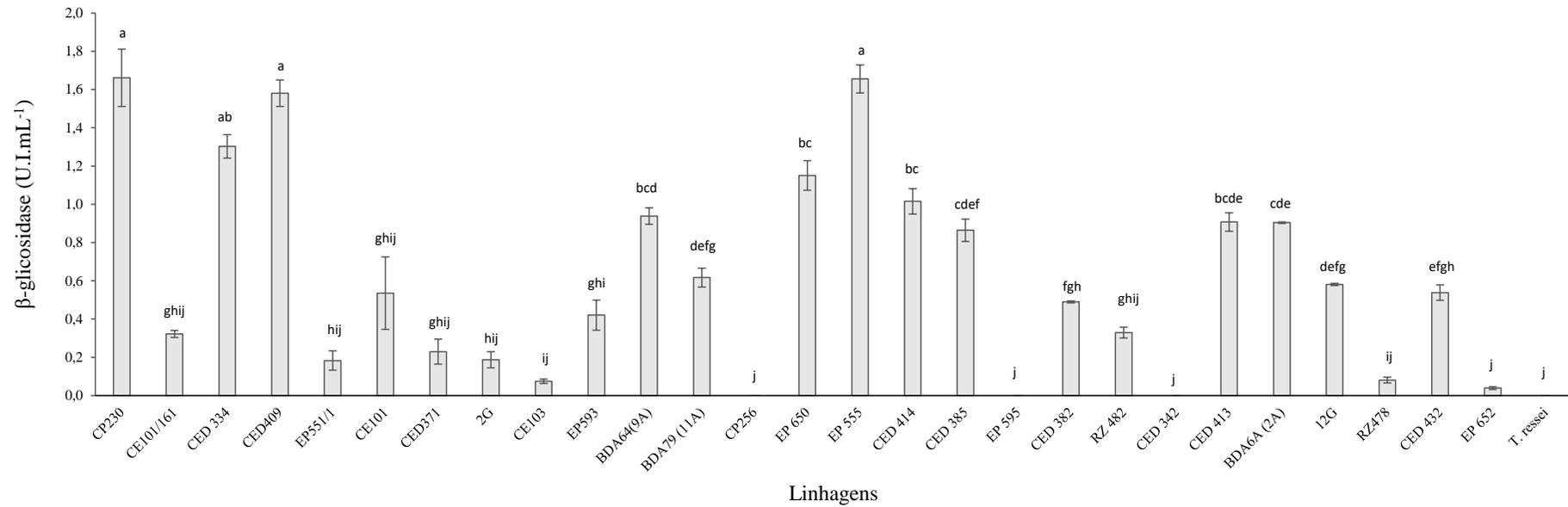


Figura 16. Avaliação da atividade enzimática de β -glicosidase do extrato bruto de 27 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* após 7 dias de cultivo em meio de Mandels e Weber suplementado com bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise e farelo de trigo. Os valores foram comparados com *T. reesei* Rut-C30. Os valores representam médias de três repetições. A última linhagem no gráfico é a cepa de referência hipercelulolítica *T. reesei* Rut-C30.

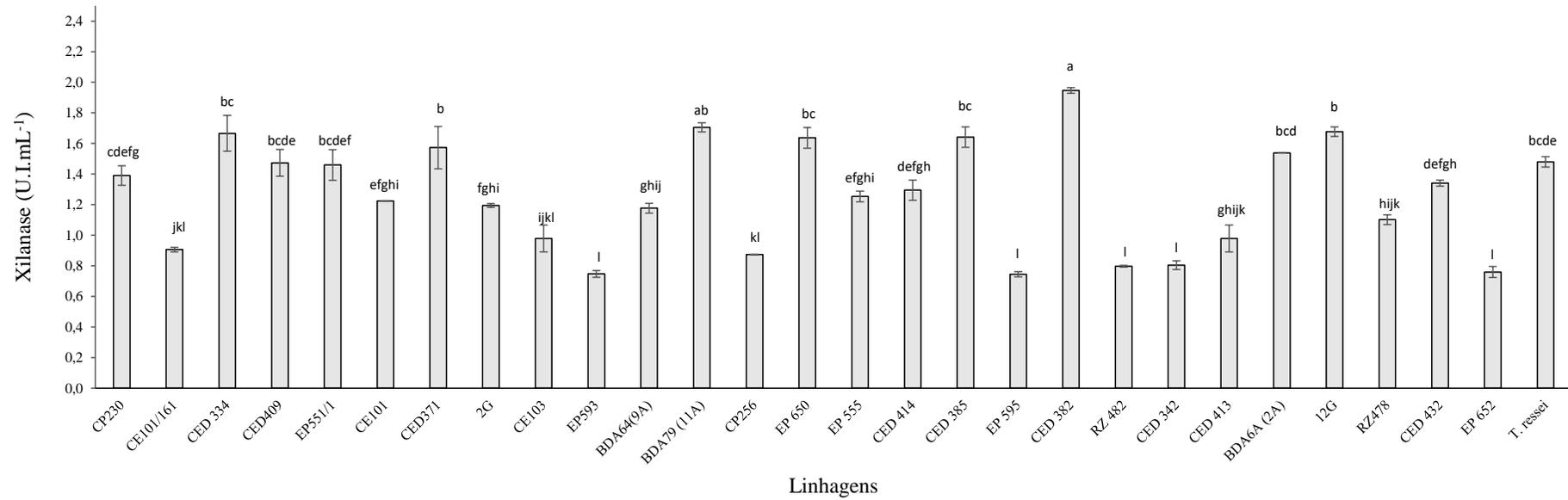


Figura 17. Avaliação da atividade enzimática de xilanase do extrato bruto de 27 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* após 7 dias de cultivo em meio de Mandels e Weber suplementado com bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise e farelo de trigo. Os valores foram comparados com *T. reesei* Rut-C30. Os valores representam médias de três repetições. A última linhagem no gráfico é a referência hipercelulolítica *T. reesei* Rut-C30.

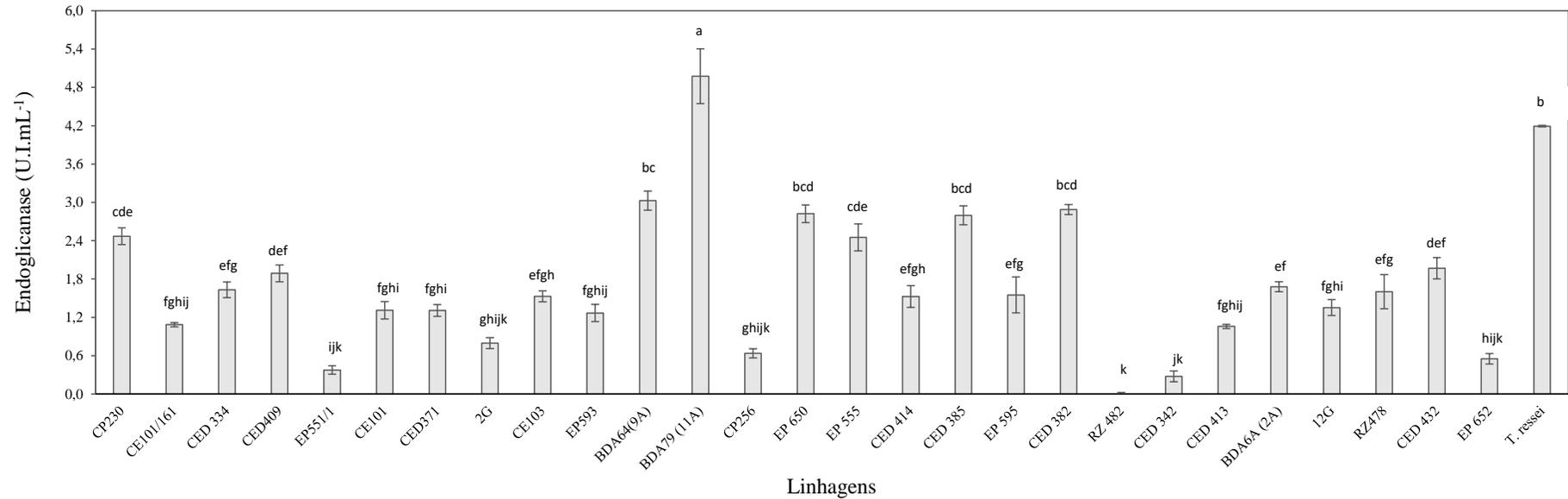


Figura 18. Avaliação da atividade enzimática de endoglucanase do extrato bruto de 27 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* após 7 dias de cultivo em meio de Mandels e Weber suplementado com bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise e farelo de trigo. Os valores foram comparados com *T. reesei* Rut-C30. Os valores representam médias de três repetições. A última linhagem no gráfico é a referência hiperclulolítica *T. reesei* Rut-C30.

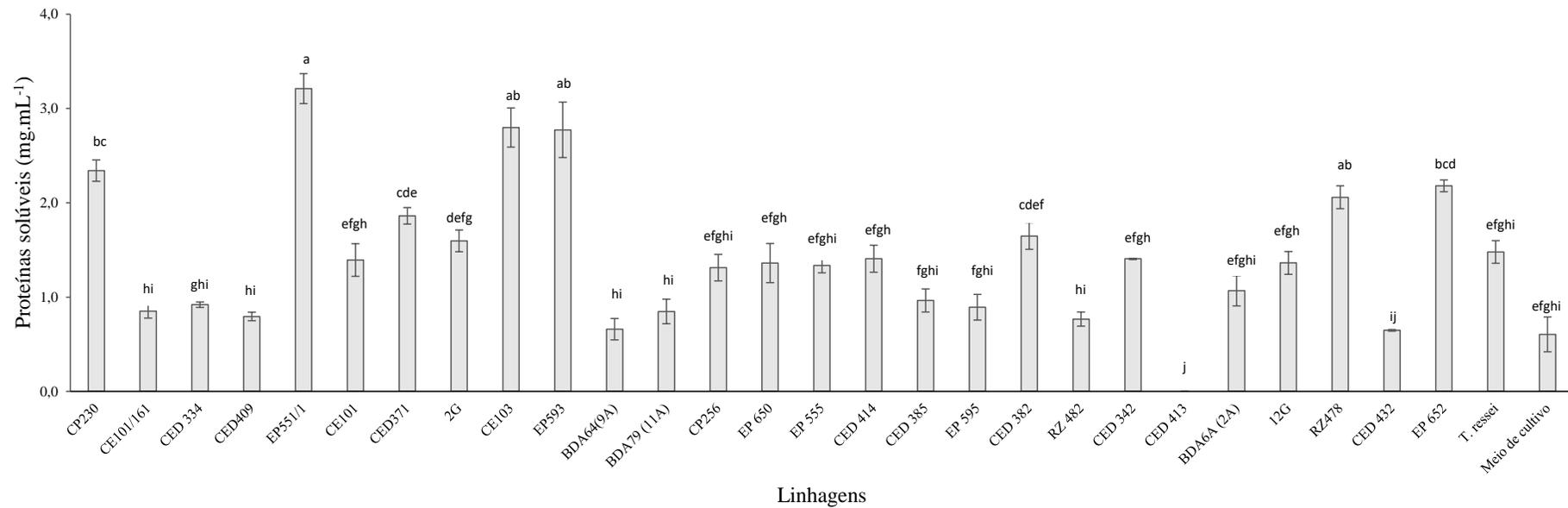


Figura 19. Determinação de proteína total do extrato bruto de 27 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* após 7 dias de cultivo em meio de Mandels e Weber suplementado com bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise e farelo de trigo. Os valores foram comparados com *T. reesei* Rut-C30. Os valores representam médias de três repetições. A última linhagem no gráfico é a referência hiperCelulolítica *T. reesei* Rut-C30.

A determinação da atividade específica das enzimas nos extratos também foi realizada e os dados são descritos na Tabela 6. A atividade específica é um parâmetro importante para avaliar a atividade enzimática em relação à quantidade de proteínas na amostra. Em geral, uma alta atividade específica é indicativa da maior concentração da enzima de interesse entre as proteínas totais da amostra. Observa-se que quando comparados com o extrato enzimático bruto da cepa mutante hiperclulolítica *T. reesei* Rut-C30, vários dos 27 extratos dos fungos endofíticos selvagens apresentaram atividade específica consideravelmente superior, nas condições utilizadas (p. ex.: endoglicanase dos extratos de *Diaporthe* sp. BDA79(11A) e de *Neofusicoccum* sp. BDA64(9A); β -glicosidase do extrato de *Neopestalotiopsis* sp. CED409; xilanase do extrato de *Diaporthe* sp. CED432) (Tabela 6). Embora a atividade específica seja variável em função de diferentes fatores (cinética do cultivo, pH, temperatura, interação das enzimas com o substrato), os dados reforçam o potencial de produção de enzimas para despolimerização de polissacarídeos de vários dos 27 fungos endofíticos selecionados, mesmo quando cultivados em condições ainda não otimizadas.

Tabela 6. Atividades específicas de FPase, xilanase, β -glicosidase e endoglicanase dos extratos enzimáticos das 27 linhagens selecionadas (UI/mg). Os valores representam as médias de 3 repetições.

Atividade específica (UI/mg)				
Linhagem	FPase	Xilanase	β -glicosidase	Endoglicanase
CP230	0,129	0,594	0,710	1,055
CE101/161	0,063	1,064	0,378	1,274
CED334	0,214	1,812	1,417	1,773
CED409	0,217	1,856	1,991	2,378
EP551/1	0,014	0,455	0,057	0,117
CE101	0,058	0,879	0,385	0,942
CED371	0,145	0,845	0,123	0,703
2G	0,059	0,748	0,117	0,499
CE103	0,046	0,350	0,027	0,546
EP593	0,070	0,270	0,152	0,457
BDA64(9A)	0,183	1,783	1,421	4,584
BDA79(11A)	0,280	2,014	0,729	5,877
CP256	0,057	0,666	0,000	0,485
EP650	0,237	1,203	0,846	2,075
EP555	0,159	0,939	1,239	1,836
CED414	0,094	0,921	0,722	1,085
CED385	0,285	1,703	0,897	2,902
EP595	0,105	0,834	0,000	1,736
CED382	0,128	1,182	0,297	1,753
RZ482	0,077	1,041	0,429	0,000

CED342	0,042	0,572	0,000	0,196
CED413	0,000	0,000	0,000	0,000
BDA6A(2A)	0,201	1,442	0,848	1,573
12G	0,154	1,231	0,427	0,994
RZ478	0,046	0,536	0,039	0,778
CED432	0,223	2,071	0,831	3,041
EP652	0,043	0,349	0,018	0,254
<i>T. reesei</i> Rut-C30	0,324	1,001	0,000	2,837

Neste trabalho diversos gêneros de fungos endofíticos de plantas tropicais de biomassa pouco explorados foram investigados com maior detalhe em relação à sua capacidade de produzir extratos enzimáticos brutos contendo enzimas para despolimerização de polissacarídeos. Com base nos dados de quantificação de atividades enzimáticas, os fungos que merecem destaque são: *Neofusicoccum* sp. EP650, *Neofusicoccum ribis* 12G, *Neofusicoccum* sp. BDA64(9A), *Talaromyces amestolkiae* CP230, *Annulohyphoxylon stygium* EP555, *Neopestalotiopsis* sp. CED409, e várias linhagens de *Diaporthe* sp. [CED385, CED382, CED371, BDA79(11A)].

Neopestalotiopsis não tem sido estudado quanto a produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos, sendo este o primeiro relato de caracterização enzimática para fungos desse gênero. Apenas um trabalho na literatura relata a produção de lacases ligadas ao micélio produzidas por linhagens endofíticas de *Neopestalotiopsis* para uso na remediação de efluentes têxteis (MARZALL-PEREIRA et al., 2019).

Neofusicoccum pertence a família *Botryosphaeriaceae* (Classe Dothideomycetes) e é reconhecido como um endófito comum, porém, várias espécies desse gênero são fitopatogênicas. Por exemplo, *Neofusicoccum parvum* causa doenças importantes no tronco de várias espécies arbóreas. O arsenal enzimático desses fungos tem um papel relevante no ciclo da doença e alguns poucos estudos foram realizados visando a caracterização enzimática de espécies de *Neofusicoccum*. Por exemplo, ESTEVES et al. (2014) avaliaram uma coleção de espécies de *Botryosphaeriaceae* por testes qualitativos em diferentes substratos, e também quantificaram atividades enzimáticas nos sobrenadantes de várias espécies de *Neofusicoccum* (após cultivo em meio mínimo contendo CMC e extrato de levedura). Os autores detectaram celulases, lipases, proteases e lacases e destacaram que as endoglicanases de diferentes espécies de *Neofusicoccum* são ativas a temperatura de 70°C. Em outro estudo, MARTÍN-SAMPEDRO et al. (2015) isolaram fungos endofíticos de *Eucalyptus* e identificaram diferentes espécies de *Neofusicoccum*. Os autores avaliaram as cepas em testes com meio sólido e detectaram a produção de lacases. Estes exemplos, juntamente com os dados de produção enzimática obtidos no presente trabalho, confirmam que espécies do gênero *Neofusicoccum* são promissoras para desconstrução de biomassa.

Outro gênero selecionado como promissor para produção de enzimas foi *Talaromyces*, no caso a espécie *T. amestolkiae*. Conforme observado nos resultados, a cepa endofítica de guaranazeiro *T. amestolkiae* CP230 produziu altos níveis de atividade de β -glicosidase (1,66 U/mL) em condições não otimizadas de cultivo e apresentou elevado potencial de sacarificação nas condições utilizadas (Figura 15).

Várias espécies de *Talaromyces* são reconhecidas pela capacidade de produção de celulases e hemicelulases. No caso de *T. amestolkiae*, merecem destaque os trabalhos realizados com as β -glicosidasas desse fungo. Por exemplo, EUGENIO et al. (2017) isolaram uma cepa de *T. amestolkiae* na Espanha e verificaram elevada capacidade de produção de β -glicosidase. Os autores relataram a produção de 1,4-1,8 U/mL em cultivos em fermentação submersa com meio de Mandels contendo diferentes fontes de carbono, inclusive na presença de glicose, o que indica que a β -glicosidase desse fungo não é retroinibida pelo produto. No caso, no presente trabalho foram obtidos níveis semelhantes de atividade de β -glicosidase em cultivo a base de bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise. Os autores também descobriram que o genoma desse fungo possui várias cópias de genes de β -glicosidase e que duas dessas proteínas são secretadas quando o fungo é cultivado em diferentes fontes de carbono. Sendo que uma delas é induzida por substrato celulósico e a outra é produzida independentemente do tipo do substrato (EUGENIO et al., 2017). A caracterização bioquímica dessas 2 proteínas revelou estabilidade em uma ampla faixa de pH e estabilidade térmica a 50°C por mais de 72 horas (MENDÉZ-LÍTER et al., 2017), o que tem permitido sua aplicação suplementar na sacarificação de biomassas lignocelulósicas em níveis comparáveis aos obtidos com β -glicosidasas comerciais (MENDÉZ-LÍTER et al., 2017).

Entre os fungos endofíticos cujos extratos mostraram altos níveis de atividade enzimática estão várias linhagens de *Diaporthe* endofíticas de guaranazeiro e de *R. mangle* (Figuras 15 a 18). Esse gênero é comumente isolado como endofítico de diversas espécies de plantas e tem sido estudado pela capacidade de produzir diversos metabólitos bioativos. No entanto, os relatos sobre o potencial de produção de enzimas lignocelulolíticas são escassos. O trabalho de MAROLDI et al. (2018) reportou a caracterização enzimática de fungos endofíticos de plantas de manguezal e seleção de cepas para sacarificação de celulose microcristalina. Os autores investigaram diferentes linhagens endofíticas de *Diaporthe* e de outros fungos. Para produção enzimática e quantificação, os fungos foram cultivados em fermentação no estado sólido em meio a base de farelo de trigo. Os autores observaram que entre os fungos avaliados, linhagens de *Diaporthe* foram as mais promissoras para produção de endoglicanase (34 U/g) e xilanase (77 U/g).

Como visto, os novos fungos selecionados têm potencial de produção de carboidrolases diversas para aplicação industrial. Considerando os resultados obtidos sobre

potencial de sacarificação (FPase) (Figura 15) dos 27 extratos avaliados, 16 foram selecionados (com base em FPase maior que 0,1 UI/mL) para continuidade da bioprospecção, agora com foco na análise de seu desempenho na hidrólise enzimática de biomassa.

3.3.4 Desempenho de hidrólise do extrato enzimático bruto (secretoma) de 16 linhagens de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle*

Seguindo-se a estratégia estabelecida de análise de extratos enzimáticos brutos na hidrólise de biomassa pré-tratada para seleção de novas linhagens de fungos lignocelulolíticos, dos 27 extratos avaliados anteriormente, 16 foram selecionados para sacarificação de biomassa, considerando os resultados obtidos na análise do potencial de sacarificação (Figura 15).

Os 16 extratos selecionados para a etapa de hidrólise de biomassa são mostrados na Tabela 7. Nota-se que foram escolhidos somente aqueles que apresentaram 0,1 UI/mL de FPase. Na Tabela 7 também é indicada a quantidade de FPU/g de massa seca que foi adicionada na reação de hidrólise com cada extrato enzimático.

Tabela 7. Valores de FPU/g dos 27 extratos enzimáticos brutos obtidos no presente trabalho. Em negrito estão marcados os 16 extratos que prosseguiram na bioprospecção, com foco na análise de seu desempenho de hidrólise.

Linhagem de fungo	UI/mL	FPU/g massa seca
CP230	0,301	2,786
CE101/161	0,054	0,495
CED 334	0,196	1,819
CED409	0,172	1,595
EP551/1	0,046	0,424
CE101	0,080	0,742
CED371	0,269	2,494
2G	0,094	0,874
CE103	0,128	1,182
EP593	0,195	1,809
BDA64(9A)	0,121	1,119
BDA79 (11A)	0,237	2,196
CP256	0,075	0,692
EP 650	0,322	2,983
EP 555	0,212	1,966
CED 414	0,132	1,220
CED 385	0,275	2,544
EP 595	0,094	0,869
CED 382	0,210	1,947
RZ 482	0,059	0,548
CED 342	0,059	0,544
CED 413	0,114	1,059
BDA6A (2A)	0,214	1,986
12G	0,209	1,940
RZ478	0,095	0,877
CED 432	0,144	1,334
EP 652	0,093	0,864

Uma vez que esse experimento de hidrólise foi realizado por meio de padronização por volume ao invés de padronização por atividade de FPase, foi realizada uma análise de correlação estatística. A análise de correlação entre FPU/g e liberação de glicose na hidrólise foi realizada para comprovar que indefere utilizar padronização por volume ou por atividade. Os extratos com maior atividade de FPase, e que conseqüentemente ofereceram maior dosagem de FPU para a reação de hidrólise, não correspondem às maiores liberações de glicose ao final da hidrólise. Os dados são aleatoriamente dispersos como mostrado na Figura 20.

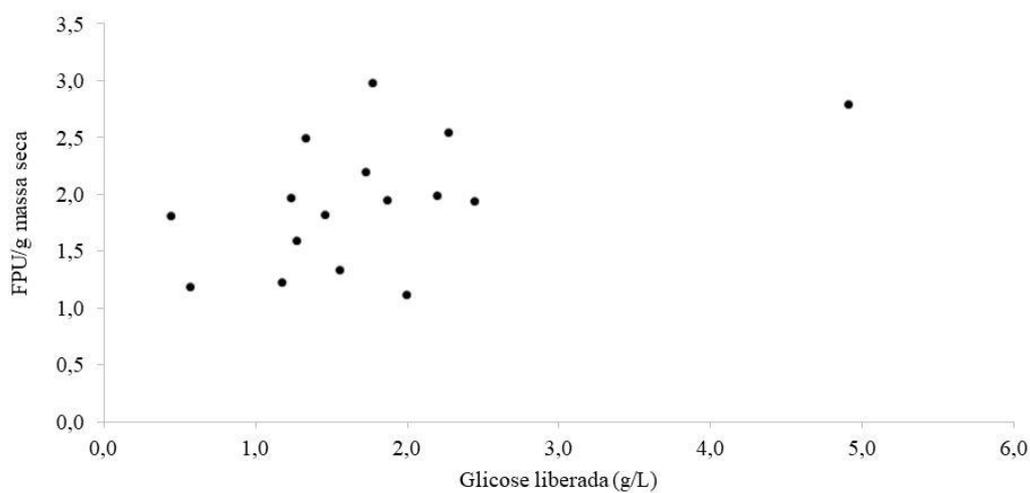


Figura 20. Dispersão de glicose liberada e FPU/g de massa seca para cada um dos 16 extratos avaliados. Para o conjunto de dados foi calculado o coeficiente de correlação produto-momento ($r=0,51$), indicando não existe uma forte dependência linear entre as variáveis.

Os resultados obtidos a partir da aplicação dos 16 extratos enzimáticos de fungos endofíticos selecionados em reações de hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise são mostrados na Figura 21. Foi possível observar que dos 16 extratos avaliados na hidrólise do bagaço, o proveniente do cultivo do fungo *Talaromyces amestolkiae* CP230 foi o que produziu o maior valor de glicose (5,163 g/L), seguido por *Neofusicoccum ribis* 12G (2,440 g/L) e *Diaporthe citri* CED385 (2,273 g/L). Com relação à produção de xilose, o extrato mais efetivo também foi o de *T. amestolkiae* CP230 (0,923 g/L), seguido por *Neofusicoccum* EP650 (0,913 g/L) e *Neofusicoccum* sp. BDA64(9A) (0,821 g/L).

Com base nesses resultados de desempenho de hidrólise, a linhagem *T. amestolkiae* CP230 foi selecionada para uma investigação mais detalhada. Ela foi submetida a um novo cultivo em fermentação submersa, tendo como fonte indutora dois tipos de bagaço pré-tratado: autohidrólise e organosolv. Essa análise foi realizada a fim de determinar qual tipo de bagaço pré-tratado é mais adequado para indução da produção de enzimas, visando futura otimização da produção de celulases por essa linhagem. Os dados são mostrados a seguir.

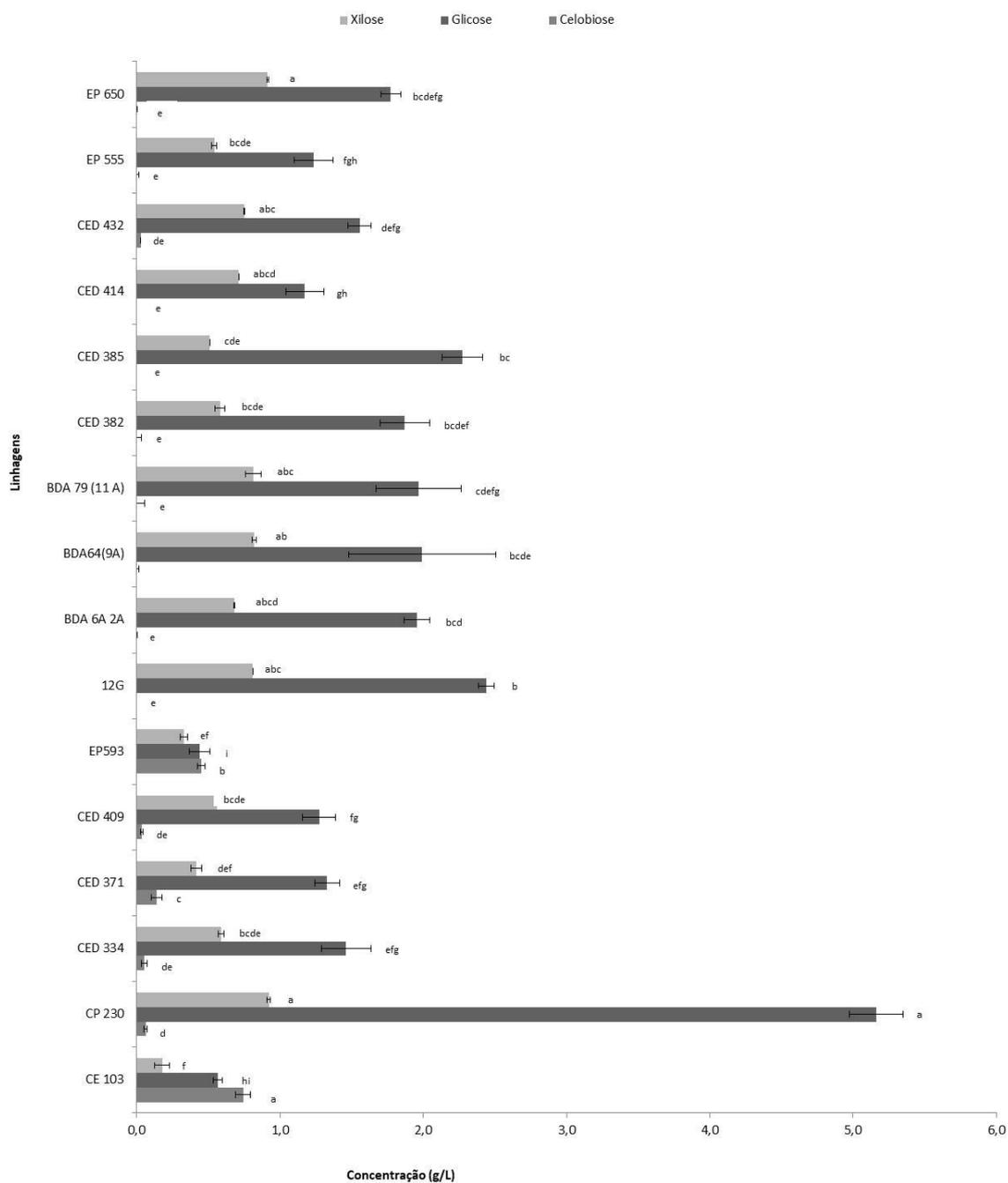


Figura 21. Concentração de glicose, xilose e celobiose (g/L) obtida após 24 horas de reação de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por autohidrólise, utilizando 16 extratos enzimáticos brutos (secretoma) provenientes do cultivo de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* em meio de Mandels e Weber com farelo de trigo e bagaço pré-tratado por autohidrólise seco e moído. Os valores representam a média de triplicatas e as barras de erro, o desvio padrão. As médias identificadas por uma mesma letra, para uma mesma resposta, não diferem significativamente segundo teste de Tukey ($p > 0,005$).

3.3.5. Análise dos extratos enzimáticos brutos obtidos dos cultivos de *T. amestolkiae* CP230 na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por autohidrólise e organosolv

Devido ao bom desempenho de hidrólise do extrato enzimático (secretoma) do fungo *T. amestolkiae* CP230 nos testes anteriores, um novo cultivo foi realizado, tendo 2 tipos de bagaço pré-tratado como fonte indutora (autohidrólise e organosolv). Este novo cultivo foi realizado para investigar o efeito do tipo de bagaço na produção enzimática e no desempenho de hidrólise, em comparação com uma enzima comercial (Cellic CTec 3). Também procurou-se determinar qual tipo de bagaço pré-tratado é mais adequado para indução da produção de enzimas, visando futura otimização da produção de celulasas por essa linhagem.

Os resultados de atividade enzimática e de determinação do teor de proteína total dos extratos oriundos dos cultivos em bagaço autohidrólise (CP230-H) e bagaço organosolv (CP230-O) são resumidos na Tabela 8. Nota-se que os níveis de β -glicosidase e de xilanase não diferiram entre os secretomas oriundos de cultivo em bagaço autohidrólise e organosolv. No entanto, as atividades de FPase e endoglicanase foram significativamente superiores quando o cultivo foi feito com bagaço autohidrólise.

Tabela 8. Atividades enzimáticas e concentração de proteína total dos extratos brutos do fungo *T. amestolkiae* CP230, em que CP230-H (cultivado em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por autohidrólise), e CP230-O (cultivado em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por organosolv). Os valores representam a média de triplicatas seguidas pelo desvio padrão. Os resultados foram comparados por teste t (comparação de médias).

	CP230-H	CP230-O	Teste t (significância 5%)
Proteína (mg/mL)	1,530 \pm 0,192	3,033 \pm 0,252	CP230-H < CP230-O
Fpase (U/mL)	0,461 \pm 0,028	0,252 \pm 0,016	CP230-H > CP230-O
Endoglucanase (U/mL)	1,718 \pm 0,128	0,201 \pm 0,014	CP230-H > CP230-O
Xilanase (U/mL)	2,547 \pm 0,679	1,936 \pm 0,118	CP230-H = CP230-O
β -glicosidase (U/mL)	5,329 \pm 0,053	5,484 \pm 0,713	CP230-H = CP230-O

A Figura 22 mostra os resultados da hidrólise de dois tipos de bagaço pré-tratado (autohidrólise e organosolv) com os extratos CP230-H e CP230-O, em comparação com a enzima comercial. É possível observar que, tanto os valores médios de glicose obtidos quanto o rendimento de glicose (%) em relação ao máximo teórico, não diferem entre si na hidrólise do bagaço pré-tratado por autohidrólise com os 3 extratos enzimáticos (Figura 22A). O mesmo comportamento foi observado durante a hidrólise do bagaço pré-tratado por organosolv (Figura 22B). Essa semelhança de desempenho de hidrólise dos extratos do fungo CP230 com a enzima comercial revela o potencial desse fungo para sacarificação de biomassas lignocelulósicas.

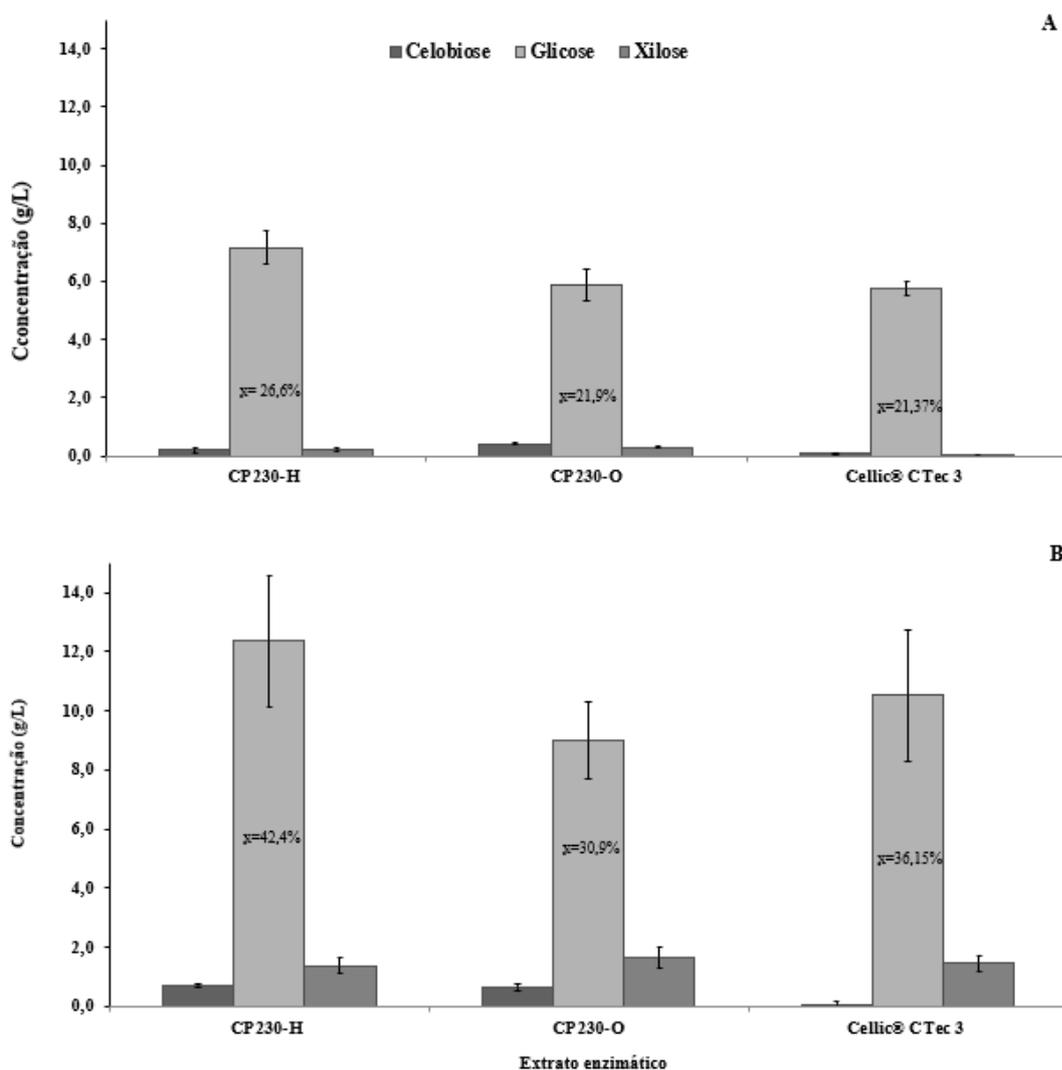


Figura 22. A. Concentração de açúcares liberada após 24 h de reação de hidrólise enzimática (5% de sólidos, 3,3 FPU/g) de biomassa pré-tratada por A) Autohidrólise e B) Organosolv. O desempenho dos extratos CP230-H (cultivo em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por autohidrólise), CP230-O (cultivo em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por organosolv) e Cellic® CTec 3 foi comparado, em pares, por Teste t de comparação de médias com nível de significância de 5%. Em A), CP230-H = CP230-O; CP230-H = Cellic® CTec; CP230-O = Cellic® CTec. Em B), CP230-H = CP230-O; CP230-H = Cellic® CTec; CP230-O = Cellic® CTec.

Também foi possível observar que maior rendimento de glicose (%) foi obtido na hidrólise do bagaço pré-tratado por organosolv, o que era esperado, dada a maior quantidade de celulose disponível para hidrólise nesse tipo de biomassa do que na biomassa pré-tratada por autohidrólise, por exemplo.

A queda de rendimento de glicose observada na hidrólise do bagaço pré-tratado por autohidrólise em comparação com o bagaço pré-tratado por organosolv foi de 14,78% para a enzima comercial, 15,8% para o extrato CP230-H, e 9% para o extrato CP230-O. Isso pode

dever-se, em particular, à presença de lignina (e seus efeitos negativos na hidrólise enzimática) no bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise, tanto em sua forma nativa quanto em sua forma degradada (por exemplo, fragmentos de lignina insolúveis em água e outros fenólicos derivados de lignina).

Conforme relatado anteriormente, *T. amestolkiae* é capaz de produzir diversas β -glicosidases com elevada estabilidade térmica e tolerância a retroinibição pela glicose, características importantes para o processo de sacarificação de biomassas pré-tratadas (MÉNDEZ-LÍTER et al., 2018; EUGENIO et al., 2017). No entanto, o desempenho de seu extrato bruto (secretoma) na sacarificação de biomassas complexas, tal como o bagaço de cana, ainda não havia sido demonstrado, o que foi feito no presente trabalho. A disponibilidade da sequencia genômica (EUGENIO et al., 2017), associada ao desenvolvimento de ferramentas para sua manipulação certamente facilitarão o melhoramento genético visando aumento da produção de enzimas para aplicações em biorrefinarias.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que a bioprospecção de fungos endofíticos de plantas de ambientes pouco explorados e *hotspots* de biodiversidade constitui uma estratégia prolífica para descoberta de novas cepas fúngicas com capacidades catalíticas e metabólicas de grande valor biotecnológico.

3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, 291 fungos endofíticos de plantas típicas da Amazônia e manguezal foram identificados e avaliados quanto ao potencial de produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos. Os resultados do presente trabalho contribuíram para o avanço do conhecimento da diversidade de fungos associados à *P. cupana* e *R. mangle* em seus ambientes naturais. Com uma abordagem robusta de prospecção, foi possível obter dados de produção destas enzimas por fungos que não têm sido tradicionalmente explorados comercialmente. Dentre estes, a linhagem *T. amestolkiae* CP230 foi selecionada como promissora para a produção de enzimas para conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis. O extrato enzimático (secretoma) produzido por essa linhagem teve desempenho semelhante ao coquetel enzimático comercial Cellic CTec 3 quando aplicado como catalisador na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. É importante ressaltar que as condições de cultivo desse fungo ainda não foram otimizadas, sugerindo que esta linhagem selvagem pode ser candidata para estudos futuros de otimização das condições de cultivo e melhoramento genético visando aumento da produção de celulases.

ANEXO 1. Avaliação de 291 fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* quanto ao índice enzimático em diferentes fontes de carbono e capacidade de crescimento em Avicel PH-101.

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Agaricales</i>	EP559	2,22d	1,73e	-	2,83e	1,00g	41,76d
<i>Agaricales</i>	EP560	-	-	-	-	-	-
<i>Agaricales</i>	EP595	2,12d	2,81d	1,95d	4,07c	-	54,29c
<i>Annulohyphoxylon</i>	EP605	1,00f	-	1,24e	-	-	27,94e
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	EP551/1	2,41d	3,94b	3,88a	1,54h	2,06d	78,18a
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	EP555	-	2,98c	2,80b	-	2,42c	30,52e
<i>Aspergillus</i>	CE130	1,79e	2,21d	1,09g	2,39f	2,14d	40,97d
<i>Aspergillus</i>	CE65 OU 69	2,10d	2,00e	1,05g	2,08g	1,98e	38,72d
<i>Aspergillus</i>	CE93	1,66e	2,13d	1,98d	2,39f	2,31c	39,62d
<i>Aspergillus</i>	CED4592	1,53e	1,54e	1,00g	1,90g	1,34f	17,14f
<i>Aspergillus</i>	EP535	1,60e	2,21d	1,99d	2,36f	2,09d	36,20d
<i>Aspergillus</i>	EP563	2,32d	2,34d	1,88e	2,98e	2,13d	34,03e
<i>Aspergillus</i>	EP615	2,42d	2,78d	2,08d	2,65f	1,98e	43,76d
<i>Aspergillus</i>	EP641	1,16f	2,26d	2,06d	2,09g	2,00e	33,71e
<i>Aspergillus</i>	EP691 (4 OU 9)	1,54e	1,93e	1,05f	2,22g	2,22d	42,02d
<i>Aspergillus</i>	RZ487	1,46e	2,16d	1,74d	2,01g	1,77e	44,04d
<i>Aspergillus</i>	CED459	1,35e	1,46e	1,58e	1,75g	1,41f	19,09f
<i>Aspergillus pseudonomius</i>	EP593	1,46f	3,74b	2,52c	4,55b	2,40c	55,58c
<i>Aspergillus pseudonomius</i>	CED428	4,18a	1,61e	1,43e	1,10i	1,00e	58,27c
<i>Clonostachys</i>	CE174	2,22d	2,28d	1,59e	3,12e	2,06d	31,62e
<i>Clonostachys</i>	CE187	2,19d	2,16d	1,38f	2,67f	2,34c	33,29e
<i>Clonostachys</i>	CED323	1,64e	2,70d	1,62e	3,13e	2,04d	39,62d
<i>Clonostachys</i>	CED324	2,04d	2,52d	1,65e	2,85e	1,21g	20,60f
<i>Clonostachys</i>	CED325	2,00d	2,10d	1,45e	2,02g	1,81e	42,64d
<i>Clonostachys</i>	CED326	2,11d	3,69b	1,59e	3,83c	2,68b	36,95d
<i>Clonostachys</i>	CED330	2,31d	2,72d	1,37f	2,67f	1,83e	42,85d

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Clonostachys</i>	CED332	2,17d	2,55d	1,40f	2,81e	2,13d	10,24g
<i>Clonostachys</i>	CED336	1,92d	2,71d	1,44e	2,69f	1,93e	40,31d
<i>Clonostachys</i>	CED340	2,36d	2,96c	1,94e	3,00e	1,92e	35,41d
<i>Clonostachys</i>	CED342	2,00d	3,12c	1,48e	3,14e	1,91e	34,28e
<i>Clonostachys</i>	CED346	2,29d	2,48d	1,60e	2,57f	1,96e	40,68d
<i>Clonostachys</i>	CED350	1,96d	2,54d	1,56e	2,57f	1,79e	38,77d
<i>Clonostachys</i>	CED359	1,62e	2,82d	-	1,95g	1,43f	10,67g
<i>Clonostachys</i>	CED361	1,80e	2,72d	1,34f	2,79e	2,12d	42,12d
<i>Clonostachys</i>	CED368	-	2,49d	1,72e	2,86e	1,84e	34,69e
<i>Clonostachys</i>	CED386	2,09d	2,05d	1,33f	2,44f	2,31c	31,81e
<i>Clonostachys</i>	CED406	2,11d	2,25d	1,48e	2,08g	1,82e	41,93d
<i>Clonostachys</i>	CED424	2,34d	-	1,64e	3,02e	2,17d	36,38d
<i>Clonostachys</i>	CED438	1,72e	1,85e	1,31f	2,51f	1,89e	4,33g
<i>Clonostachys</i>	CED441	1,99d	2,60d	1,48e	2,54f	2,16d	13,85f
<i>Clonostachys</i>	CP258	1,15e	2,77d	1,56e	2,60f	1,24f	30,28e
<i>Clonostachys</i>	CP288	1,72e	2,67d	1,38f	2,27g	2,18d	18,79f
<i>Clonostachys</i>	EP562	1,97d	2,05d	1,54e	2,22g	1,76e	34,52e
<i>Clonostachys</i>	EP571	1,12f	2,10d	1,34f	1,94g	1,66e	38,29d
<i>Clonostachys</i>	EP574	2,22d	2,12d	1,51e	2,31f	1,96e	35,18d
<i>Clonostachys</i>	EP594	2,10d	1,83e	1,57e	3,08e	2,15d	19,88f
<i>Clonostachys</i>	EP626	2,42d	2,06d	1,62e	2,35f	2,01e	38,16d
<i>Clonostachys</i>	EP630	-	1,56e	-	1,92g	1,61e	24,93e
<i>Clonostachys</i>	EP652	2,98c	2,36d	1,44e	2,03g	1,84e	38,14d
<i>Clonostachys</i>	RZ474	2,19d	2,40d	1,73d	2,56f	1,09g	10,70g
<i>Clonostachys</i>	RZ484	2,09d	2,68d	1,80d	2,87e	2,28c	34,34e
<i>Clonostachys</i>	RZ510	2,14d	2,28d	1,42e	2,82e	2,15d	31,78e
<i>Clonostachys</i>	CP256	1,63e	2,56d	1,68e	2,54f	2,07d	79,40a

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Clonostachys</i>	CED421	1,53e	2,39d	1,73e	2,44f	1,24f	9,54g
<i>Clonostachys</i>	CE155	1,15f	2,12d	1,58e	2,32f	1,67e	33,85e
<i>Clonostachys</i>	CE32	2,15d	2,00e	1,43e	1,68g	1,53f	38,77d
<i>Clonostachys</i>	CE72	1,91d	2,41d	1,43e	2,16g	2,07d	17,64f
<i>Clonostachys</i>	CED347	2,16d	2,72d	1,55e	2,89e	2,06d	41,75d
<i>Clonostachys</i>	CED348	2,33d	2,43d	1,48e	2,53f	2,42c	36,47d
<i>Clonostachys</i>	CED352	1,88d	2,02d	1,85e	2,17g	1,74e	19,37f
<i>Clonostachys</i>	CED354	1,67e	1,97d	1,50e	2,04g	1,41f	13,08g
<i>Clonostachys</i>	CED393	2,10d	2,58d	1,56e	1,44h	1,16g	10,81g
<i>Clonostachys</i>	CED394	1,86d	2,42d	1,40f	2,20g	2,41c	42,53d
<i>Clonostachys</i>	CED405	2,13d	2,51d	1,86e	2,53f	2,32c	37,25d
<i>Clonostachys</i>	CED441/2	2,27d	2,58d	1,52e	2,21g	1,96e	35,03e
<i>Clonostachys</i>	CED444	2,19d	2,37d	1,87e	2,39f	1,88e	38,95d
<i>Clonostachys</i>	CED449 B	1,79e	2,35d	1,75e	2,52f	1,71e	33,15e
<i>Clonostachys</i>	CED612	2,07d	1,76e	1,28f	3,05e	2,31c	11,36g
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	52G	2,04d	1,17f	1,51e	1,38h	1,00g	50,71c
<i>Cordyceps</i>	EP616	1,98d	2,46d	1,78d	3,25d	1,91e	39,61d
<i>Diaporthe</i>	CED398	-	2,41d	1,00g	2,55f	-	32,68e
<i>Diaporthe</i>	11G	1,62e	2,83d	2,34c	2,59f	2,42c	3,95g
<i>Diaporthe</i>	60G	1,66e	1,61e	1,39f	1,48h	1,45f	71,59b
<i>Diaporthe</i>	BDA79(11A)	3,67b	2,81d	1,81e	3,66d	1,50f	-
<i>Diaporthe</i>	CE114	-	1,93e	-	-	-	11,67g
<i>Diaporthe</i>	CED341	1,61e	1,39f	-	1,42h	-	35,00e
<i>Diaporthe</i>	CED362/2	2,58d	1,56e	1,75e	1,00i	1,44f	69,22b
<i>Diaporthe</i>	CED364	2,16d	1,52e	2,00d	1,00i	1,35f	58,56c
<i>Diaporthe</i>	CED367	1,00f	1,10f	1,75e	1,11i	-	77,81a
<i>Diaporthe</i>	CED385	3,45b	2,05d	2,44c	1,09i	1,55f	61,57c

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Diaporthe</i>	CED388	-	3,18c	3,36b	-	-	21,21f
<i>Diaporthe</i>	CED404	2,56d	2,45d	1,79e	1,22i	1,54f	30,22e
<i>Diaporthe</i>	CED412	3,58b	1,74e	3,11b	1,50h	1,45f	32,52e
<i>Diaporthe</i>	CED414	1,00f	-	2,83b	-	-	79,70a
<i>Diaporthe</i>	CED417/2	1,60e	-	-	-	-	79,70a
<i>Diaporthe</i>	CED420	2,84c	1,10f	1,72e	1,00i	1,66e	53,28c
<i>Diaporthe</i>	CED426	3,22c	1,00f	2,11d	1,60g	1,12g	79,26a
<i>Diaporthe</i>	CED429	2,14d	1,97e	1,73e	1,09i	1,19g	60,24c
<i>Diaporthe</i>	CED431	-	-	-	-	-	32,21e
<i>Diaporthe</i>	CED432	3,22c	1,42e	1,81e	1,00i	1,38f	85,00a
<i>Diaporthe</i>	CED433/1	2,05d	1,85e	-	1,57h	1,00g	36,60d
<i>Diaporthe</i>	CED440	3,63b	2,18d	1,55e	1,00i	1,39f	42,33d
<i>Diaporthe</i>	CED443	2,60d	2,20d	2,09d	1,21i	1,14g	52,36c
<i>Diaporthe</i>	CED458	2,70d	1,00f	2,50c	1,25h	1,29f	56,89c
<i>Diaporthe</i>	EP541	2,85c	1,35f	1,89e	1,00i	1,00g	44,73d
<i>Diaporthe</i>	EP578	1,00f	1,54e	1,61e	1,33h	-	53,13c
<i>Diaporthe</i>	EP579	1,00f	1,45e	1,26f	1,56h	-	29,97e
<i>Diaporthe</i>	EP583	1,00f	1,67e	1,00f	1,36h	-	31,78e
<i>Diaporthe</i>	CED371	4,05a	1,62e	2,07d	-	1,16g	70,51b
<i>Diaporthe</i>	CED382	3,97a	2,20d	2,50c	1,00i	1,11g	56,68c
<i>Diaporthe</i>	CED413	1,35e	1,63e	3,54a	1,97g	-	44,50d
<i>Diaporthe</i>	14G	2,01d	2,26d	1,98d	2,29f	1,61e	49,30c
<i>Diaporthe</i>	20G	3,24c	1,48e	1,81e	2,90e	-	24,51e
<i>Diaporthe</i>	CED362/1	3,06c	1,67e	2,13d	1,04i	1,00g	67,00b
<i>Diaporthe</i>	CED395I	3,23c	1,87e	2,02d	1,00i	1,00g	54,01c
<i>Diaporthe</i>	CED419	2,10d	2,22d	-	2,80e	-	44,50d
<i>Diaporthe</i>	CED423	2,94c	2,25d	2,65c	1,21i	1,00g	54,28c

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Diaporthe</i>	CED427	-	2,17d	2,53c	2,59f	-	53,40c
<i>Diaporthe</i>	CED433/2	1,32e	-	-	-	-	53,15c
<i>Diaporthe</i>	EP568	2,37d	1,59e	1,46e	1,23g	1,13g	77,64a
<i>Dokmaia</i>	EP618	1,00f	1,00f	2,24c	2,23g	1,21g	27,20e
<i>Dokmaia</i>	EP642	1,22f	2,58d	1,70d	1,00i	1,46f	26,44e
<i>Eurotiomycetes</i> (classe)	EP584	1,81e	2,32d	1,51e	2,01g	1,87e	39,19d
<i>Eutypa</i>	EP5962	1,00f	-	-	-	-	20,56f
<i>Fusarium</i>	30G	1,76e	1,27f	1,28f	1,83g	1,46f	6,00g
<i>Fusarium</i>	50G	1,39e	2,39d	1,00g	2,20g	1,61e	31,67e
<i>Fusarium</i>	65G	1,69e	1,77e	1,29f	2,06g	1,64e	68,74b
<i>Fusarium</i>	BDA102 (16A)	2,63d	2,15d	2,37c	2,12g	-	21,82f
<i>Fusarium</i>	BDA75 (10A)	1,69e	1,62e	1,25f	1,94g	1,53f	79,36a
<i>Fusarium</i>	CED353	2,29d	2,15d	1,65e	2,12g	2,23d	47,89c
<i>Fusarium</i>	CED358	1,62e	1,91e	1,37f	1,62g	1,52f	49,76c
<i>Fusarium</i>	CED370	1,99d	2,39d	1,84e	2,17g	1,83e	61,11c
<i>Fusarium</i>	CED379	1,96d	1,82e	1,53e	1,79g	1,35f	67,77b
<i>Fusarium</i>	CED446	1,00f	2,25d	1,48e	2,12g	1,64e	79,70a
<i>Fusarium</i>	CED452	1,85d	1,64e	1,28f	1,76g	1,01g	62,04c
<i>Fusarium</i>	EP530	2,00d	1,84e	1,77e	2,03g	1,69e	70,43b
<i>Fusarium</i>	EP536	1,40e	1,92e	1,37f	1,84g	1,54f	60,00c
<i>Fusarium</i>	EP547	2,55d	1,76e	1,66e	2,17g	1,65e	56,02c
<i>Fusarium</i>	EP588	1,58e	2,00e	-	2,06g	1,33f	65,05c
<i>Fusarium</i>	EP602	2,01d	1,89e	1,64e	2,09g	1,75e	61,91c
<i>Fusarium</i>	EP607	2,25d	2,14d	1,63e	2,20g	1,75e	67,95b
<i>Fusarium</i>	EP608	2,23d	1,89e	1,48e	1,80g	1,97e	79,40a
<i>Fusarium</i>	EP610	1,90d	1,47e	1,53e	1,73g	1,58e	46,76d
<i>Fusarium</i>	EP624	2,64c	2,41d	2,33c	2,01g	1,00g	25,11e

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Fusarium</i>	EP628	2,42d	1,00f	1,72d	1,95g	1,65e	60,09c
<i>Fusarium</i>	EP633	2,21d	1,97e	1,45e	1,97g	1,99e	68,17b
<i>Fusarium</i>	EP639	2,23d	1,90e	1,65e	2,44f	2,00e	63,91c
<i>Fusarium</i>	L1RC3(68-1)	1,39e	2,02d	1,29e	1,93g	1,53f	8,30g
<i>Fusarium</i>	L2FB3 21-1(38A)	1,27f	1,58e	1,38e	1,82g	1,29f	6,25g
<i>Fusarium</i>	RZ463	1,67e	1,67e	1,31e	1,21i	1,64e	17,85f
<i>Fusarium</i>	RZ475/1	1,88d	2,87d	1,48e	1,04i	1,65e	39,20d
<i>Fusarium</i>	RZ480	2,20d	2,57d	1,56e	1,83g	1,88e	39,20d
<i>Fusarium</i>	RZ495	1,63e	2,21d	1,29e	2,00g	1,60e	66,76b
<i>Fusarium</i>	RZ496	1,61e	2,33d	1,33e	2,17g	1,06g	11,21g
<i>Fusarium</i>	RZ506	2,10d	1,83e	1,88d	2,16g	1,04g	35,34d
<i>Fusarium</i>	RZ511	2,20d	1,52e	2,30c	1,79g	1,45f	48,51c
<i>Fusarium</i>	RZ513/2	2,26d	2,00e	1,39e	1,87g	1,77e	69,90b
<i>Fusarium</i>	RZ513/2 B	2,33d	1,91e	1,47e	1,96g	1,65e	72,66b
<i>Fusarium</i>	CED357	1,81e	-	1,40f	1,64g	1,51f	58,05c
<i>Fusarium</i>	CED4591	2,99c	2,45d	1,62e	2,08g	1,74e	42,48d
<i>Fusarium</i>	CED460	2,05d	2,09d	2,06d	2,03g	2,01e	46,19d
<i>Fusarium solani</i>	RZ482	2,05d	1,94e	1,37e	2,07g	1,61e	78,22a
<i>Lasiodiplodia</i>	CED450	1,00f	2,33d	2,02d	2,44f	1,49f	79,70a
<i>Lasiodiplodia</i>	CED333	2,24d	1,00f	1,00g	1,00i	-	28,93e
<i>Não determinado</i>	10G	-	-	2,49 c	2,11g	-	24,56e
<i>Não determinado</i>	EP544	2,25d	2,61d	1,90r	2,15g	1,83c	23,15f
<i>Não determinado</i>	EP549	1,31f	1,72e	1,48e	1,47h	1,20g	20,75f
<i>Não determinado</i>	EP545	2,20d	1,70e	1,45e	2,03g	1,41f	66,61b
<i>Não determinado</i>	BDA101(15A)	1,77e	1,50e	1,53e	1,82g	1,59e	2,40g
<i>Não determinado</i>	BDA44A (5A)	1,16f	1,30f	1,25f	1,42h	1,00g	8,30g
<i>Não determinado</i>	BDA57 (7A)	1,30f	1,22f	1,09g	1,30h	1,00g	8,30g

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Não determinado</i>	BDA85 (12A)	1,47e	1,79e	2,22d	3,03e	-	41,37d
<i>Não determinado</i>	CE104	1,48e	1,36f	1,00g	1,26h	1,00g	79,70a
<i>Não determinado</i>	CE82	-	1,89e	2,76b	3,05e	1,67e	36,46d
<i>Não determinado</i>	CED329	2,34d	2,32d	1,75e	2,68f	1,12g	9,85g
<i>Não determinado</i>	CED338	3,41b	1,91e	1,65e	1,77g	1,00g	38,98d
<i>Não determinado</i>	CED345A	1,20f	1,98e	1,94e	1,65g	1,63e	17,76f
<i>Não determinado</i>	CED349	2,22d	2,43d	1,42e	-	2,12d	37,81d
<i>Não determinado</i>	CED351	2,00d	2,84d	1,66e	2,47f	1,72e	35,04e
<i>Não determinado</i>	CED375	2,02d	2,60d	1,87e	2,87e	1,25f	10,73g
<i>Não determinado</i>	CED403	3,19c	1,19f	1,53e	1,26h	1,30f	68,60b
<i>Não determinado</i>	CED422	2,79c	1,45e	1,93e	1,19i	1,41f	77,94a
<i>Não determinado</i>	CED449	1,33e	1,53e	1,45e	2,02g	1,12g	79,70a
<i>Não determinado</i>	CED462	2,43d	2,32d	1,93e	2,47f	2,14d	28,39e
<i>Não determinado</i>	EP318	1,96d	2,65d	1,87e	1,75g	-	43,28d
<i>Não determinado</i>	EP531	-	1,94e	2,61c	2,80e	1,46f	26,24e
<i>Não determinado</i>	EP549/1	2,13d	3,65b	2,58c	1,11i	1,23f	16,53f
<i>Não determinado</i>	EP549/2	2,08d	1,98e	1,94e	1,75g	1,55f	22,23f
<i>Não determinado</i>	EP550	2,19d	-	1,52e	2,00g	1,70e	73,64b
<i>Não determinado</i>	EP553	-	-	-	2,94e	1,33f	39,60d
<i>Não determinado</i>	EP554	-	-	-	1,75g	-	24,56e
<i>Não determinado</i>	EP564	1,61e	2,40d	1,94e	1,72g	1,00g	56,94c
<i>Não determinado</i>	EP570	1,68e	1,34f	1,74e	1,80g	1,00g	19,98f
<i>Não determinado</i>	EP572	2,10d	2,19d	-	2,20g	1,58e	31,63e
<i>Não determinado</i>	EP573	2,35d	2,24d	1,79d	2,47f	1,60e	10,21g
<i>Não determinado</i>	EP575	-	-	1,67e	4,13c	1,15g	7,58g
<i>Não determinado</i>	EP576	1,00f	2,57d	2,98b	1,90g	-	64,87c
<i>Não determinado</i>	EP577	2,08d	2,37d	1,55e	2,19g	1,34f	17,71f

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Não determinado</i>	EP580	2,01d	2,61d	1,77d	2,85e	1,95e	33,91e
<i>Não determinado</i>	EP5801	1,00f	1,75e	1,45e	1,99g	1,64e	35,97d
<i>Não determinado</i>	EP581	1,89d	3,35c	1,51e	1,83g	1,26f	10,90g
<i>Não determinado</i>	EP585	2,77c	1,51e	2,49c	1,10i	1,63e	61,37c
<i>Não determinado</i>	EP598	2,46d	1,45e	1,94d	1,00i	1,32f	56,34c
<i>Não determinado</i>	EP599	2,34d	2,68d	1,39e	1,00i	1,04g	9,87g
<i>Não determinado</i>	EP599N	-	2,25d	3,11b	2,65f	1,80e	26,19e
<i>Não determinado</i>	EP600	1,79e	2,54d	1,98d	2,43f	1,92e	30,97e
<i>Não determinado</i>	EP601	1,88d	1,73e	1,66e	1,83g	1,72e	71,96b
<i>Não determinado</i>	EP603	2,75c	2,27d	1,78d	2,07g	1,96e	62,52c
<i>Não determinado</i>	EP606	1,92d	1,06f	2,01d	1,66g	1,55f	25,38e
<i>Não determinado</i>	EP6091	1,00f	1,57e	1,61e	1,63g	1,20g	49,14c
<i>Não determinado</i>	EP6092	-	2,12d	1,02f	2,95e	2,26d	27,07e
<i>Não determinado</i>	EP612	2,02d	1,71e	1,79d	1,85g	1,38f	39,20d
<i>Não determinado</i>	EP613 A	-	-	1,88d	2,34f	-	-
<i>Não determinado</i>	EP614	-	2,02d	3,18b	3,33d	2,34c	33,60e
<i>Não determinado</i>	EP621	3,39b	1,70e	2,03d	2,55f	1,00g	76,09a
<i>Não determinado</i>	EP623	2,10d	1,46e	2,25c	1,47h	1,12g	64,45c
<i>Não determinado</i>	EP632	1,52e	1,69e	0,50f	1,90g	1,46f	79,40a
<i>Não determinado</i>	EP634	2,17d	2,32d	1,72d	2,17g	1,00g	9,69g
<i>Não determinado</i>	EP644/1	1,80e	2,18d	1,74d	2,20g	-	36,55d
<i>Não determinado</i>	EP647	1,35e	1,76e	1,44e	1,87g	1,24f	59,13c
<i>Não determinado</i>	EP649	1,91d	2,28d	1,67e	2,68f	2,34c	16,77f
<i>Não determinado</i>	EP654	1,96d	1,58e	1,50e	2,93e	1,73e	51,63c
<i>Não determinado</i>	L1RC411/36-1(33A)	1,00f	1,33f	1,86d	1,50h	1,00g	8,30g
<i>Não determinado</i>	L2RB3 20-1 (42A)	-	-	-	-	-	79,82a
<i>Não determinado</i>	RZ468	2,23d	1,56e	1,88d	1,54h	-	31,51e

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Não determinado</i>	RZ494	1,55e	2,08d	1,43e	2,33f	1,02g	10,51g
<i>Não determinado</i>	RZ497	2,27d	2,16d	1,33e	1,00i	1,63e	39,20d
<i>Não determinado</i>	RZ498	1,97d	1,46e	1,64e	1,58g	1,39f	8,87g
<i>Não determinado</i>	RZ499	2,39d	2,15d	2,02d	2,26g	1,24f	26,15e
<i>Não determinado</i>	RZ499 NOVO	1,94d	1,76e	1,23e	2,41f	1,15g	9,95g
<i>Não determinado</i>	RZ502	-	1,73e	1,42e	1,78g	1,45f	27,14e
<i>Não determinado</i>	RZ504	2,13d	2,13d	1,83d	1,95g	2,06d	38,25d
<i>Não determinado</i>	RZ516	1,83e	2,15d	1,59e	2,17g	1,28f	10,22g
<i>Não determinado</i>	RZ518	1,92e	2,73d	1,51e	2,66f	2,32c	21,07f
<i>Não determinado</i>	RZ520	1,61e	2,35d	1,81d	1,72g	1,70e	79,70a
<i>Não determinado</i>	RZ522	2,27d	2,53d	-	1,81g	1,61e	68,00b
<i>Não determinado</i>	RZ524	1,00f	1,09f	1,00f	1,19i	1,00g	77,01a
<i>Neofusicoccum</i>	12G	1,52e	3,42b	3,02b	3,08e	2,39c	75,03a
<i>Neofusicoccum</i>	2G	1,46e	2,76d	2,65c	3,01e	2,13d	79,68a
<i>Neofusicoccum</i>	BDA64 (9A)	1,25f	2,96c	2,56c	2,49f	2,32c	80,00a
<i>Neofusicoccum</i>	BDA6A (2A)	1,59e	3,35c	1,57e	3,50d	2,09d	80,13a
<i>Neofusicoccum</i>	EP650	3,54b	1,94e	2,52c	4,29b	3,01b	43,05d
<i>Neopestalotiopsis</i>	CED409	2,09d	3,85b	3,21b	4,69b	-	68,77b
<i>Neopestalotiopsis</i>	CED334	2,91c	-	4,03a	4,43b	4,14a	67,44b
<i>Neurospora dictyophora</i>	73G	-	-	2,45c	-	-	79,00a
<i>Ophiocordyceps</i>	RZ513/1	2,17d	2,68d	1,53e	2,42f	2,13d	31,84e
<i>Paecilomyces</i>	EP609	1,96d	2,17d	-	2,88e	1,18g	79,70a
<i>Paecilomyces</i>	EP611	-	1,91e	2,48c	2,06g	1,20g	34,81e
<i>Paecilomyces</i>	RG486	1,51e	1,88e	1,76d	2,23g	1,00g	10,67g
<i>Paraconiothyrium</i>	CE101	1,50e	3,08c	-	6,02a	2,31c	10,94g
<i>Paraconiothyrium</i>	CE101/161	-	5,26a	1,00g	6,36a	2,76b	13,34g
<i>Penicillium</i>	22G	1,75e	1,69e	1,92e	1,64g	1,53f	18,66f

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Penicillium</i>	CED335	-	-	1,06g	1,54h	-	16,58f
<i>Penicillium</i>	EP558	1,79e	1,63e	1,61e	1,57h	1,00g	54,59c
<i>Penicillium</i>	EP597	1,33e	1,40f	1,00f	1,00i	-	28,66e
<i>Penicillium</i>	EP5972	-	1,00f	1,00f	1,47h	-	21,72f
<i>Penicillium</i>	RZ464	1,89d	1,78e	1,50e	1,84g	1,00g	42,04d
<i>Penicillium</i>	RZ481	2,47d	2,17d	2,02d	2,10g	1,74e	11,92g
<i>Penicillium</i>	RZ491NOVO	1,72e	1,93e	1,84d	2,53f	1,26f	30,08e
<i>Penicillium</i>	RZ505	1,75e	2,54d	2,64c	2,50f	1,64e	14,27f
<i>Penicillium</i>	RZ478	2,12d	1,77e	1,77d	1,84g	1,73e	79,37a
<i>Penicillium citrinum</i>	CED343	1,56e	2,41d	1,91e	3,04e	2,08d	23,85f
<i>Phialemonium</i>	EP566	1,46e	2,23d	1,80e	3,52d	2,45c	7,83g
<i>Sarocladium</i>	71G	1,33e	3,50b	1,43e	3,08r	2,20d	1,90g
<i>Talaromyces</i>	CED322	-	1,47e	1,06g	1,93g	-	14,76f
<i>Talaromyces</i>	EP551/2	1,34e	-	-	1,00i	-	18,81f
<i>Talaromyces</i>	RZ470	1,62e	2,30d	2,26c	1,41h	1,95e	17,16f
<i>Talaromyces</i>	RZ471	1,08f	2,69d	1,21e	3,00e	1,69e	27,84e
<i>Talaromyces</i>	RZ475/2	1,37e	1,00f	1,87d	1,90g	1,68e	10,22g
<i>Talaromyces</i>	RZ485	2,80c	1,95e	2,08d	2,74f	1,42f	24,41e
<i>Talaromyces</i>	RZ491	2,02d	3,00c	2,14d	2,04g	1,21g	8,20g
<i>Talaromyces</i>	RZ521	2,06d	1,82e	2,07d	2,24g	1,26f	11,72g
<i>Talaromyces aculeatus</i>	CED411	2,08d	2,50d	1,61e	2,62f	2,21d	9,10g
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CP230	2,32d	3,62b	1,57e	3,38d	2,06d	24,29e
<i>Talaromyces apiculatus</i>	EP551/3	3,27c	1,69e	1,95e	2,09g	1,00g	22,73f
<i>Talaromyces pinophilus</i>	CP2191	1,04f	2,35d	1,07g	1,89g	2,06d	38,54d
<i>Trametes versicolor</i>	B1F1A (17A)	-	-	-	-	-	2,00g
<i>Trichoderma</i>	51G	1,00f	1,34f	1,24f	1,47h	1,00g	6,4g
<i>Trichoderma</i>	6G	1,10f	1,23f	1,16g	1,28h	1,00g	76,00a

Classificação taxonômica	Código das cepas	Índice enzimático ⁽¹⁾ em diferentes fontes de carbono (após 6 dias a 25°C)					Crescimento (mm) em Avicel (após 4 dias a 25°C)
		CMC	Xilana	Pectina (pH 5)	Pectina (pH 7)	Amido	
<i>Trichoderma</i>	BDA-A3R1-2 (18A)	1,24f	1,23f	1,24f	1,40h	1,00g	79,73a
<i>Trichoderma</i>	CE103	1,20f	1,00f	1,32f	2,17g	1,00g	79,70a
<i>Trichoderma</i>	CED363	-	1,59e	-	2,03g	-	79,70a
<i>Trichoderma</i>	EP613	1,17f	1,43e	1,33e	1,00i	2,08d	14,48f
<i>Trichoderma</i>	RZ476	-	1,56e	1,39e	1,34h	-	77,39a
<i>Trichoderma</i>	RZ477	-	-	-	-	-	38,99d
<i>Trichoderma</i>	RZ488	1,00f	1,00f	1,32e	1,22i	1,00g	49,04c
<i>Trichoderma</i>	RZ512	1,08f	1,78e	1,21e	1,15i	1,44f	39,20d
<i>Trichoderma</i>	RZ525	1,20f	1,17f	1,00f	1,29h	1,00g	79,70a
<i>Trichoderma</i>	RZ526	1,00f	1,04f	1,00f	1,14i	1,00g	76,57a
<i>Trichoderma</i>	24G	1,00f	1,24f	1,29f	1,25h	1,00g	78,90a
<i>Trichoderma</i>	CED369	-	1,79e	1,69e	2,27g	1,32f	77,70a
<i>Trichoderma</i>	CED418	1,63e	2,07d	1,64e	1,67g	1,15g	20,11f
<i>Trichoderma</i>	CED445	2,27d	2,52d	1,46e	2,43f	1,54f	79,70a
<i>Trichoderma asperelloides</i>	23G	-	-	-	-	-	0,85g
<i>Trichoderma asperelloides</i>	CE104 NOVO	1,23f	1,00f	1,27f	1,33h	1,15g	18,66f
<i>Trichoderma asperelloides</i>	CE11	1,00f	1,65e	1,44e	1,62g	1,42f	34,76e
<i>Trichoderma lentiforme</i>	CED448	-	1,92e	1,57e	1,65g	1,47f	79,70a
<i>Trichoderma lentiforme</i>	CE103 NOVO	1,12f	1,00f	1,11g	1,51h	1,00g	79,70a
<i>Trichoderma spirale</i>	CE145	2,17d	2,31d	1,12g	2,09g	2,19d	79,70a
<i>Xylaria</i>	19G	2,42d	1,80e	1,78e	2,13g	1,00g	2,00g
<i>Xylariales</i> (ordem)	31G	1,10f	-	-	3,36d	-	8,02g

⁽¹⁾Índice enzimático: razão entre o diâmetro do halo de degradação enzimática e o diâmetro da colônia. Valores > 1 indicam secreção de enzimas no meio de cultura resultando em uma zona de degradação visível ao redor da colônia. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott (alfa=0,05). (-) Ausência de crescimento. Para cada substrato são apresentadas as médias de três repetições por linhagem. Os substratos carboximetilcelulose (CMC), xilana, pectina (pH 5,0), pectina (pH 7,0), amido e Avicel PH-101 são utilizados para detecção de atividade de endoglicanase, xilanase, poligalacturonase, pectina liase, amilase e celulases totais, respectivamente.

ANEXO 2. Classificação taxonômica de 27 cepas selecionadas de fungos endofíticos de *P. cupana* e *R. mangle* com base na análise da sequência do gene EF1 α (tef1).

Linagens	Primers	Pares de bases	GenBank	Mycobank	CBS
2G	EF1-728F/EF1 986R	280	99.63% <i>Neofusicoccum kwambonambiense</i> (EU821870.1)	99,64% <i>Neofusicoccum parvum</i> (CBS 122553EU683654)	99,64% <i>Neofusicoccum parvum</i> (CBS122553)
12G	EF1-728F/EF1 986R	289	97.91% <i>Neofusicoccum parvum</i> (KF766426.1)	98,27% <i>Botryosphaeria parva</i> (CBS 110301)	98,56% <i>Neofusicoccum parvum</i> (CBS122553)
BDA6A(2A)	EF1-728F/EF1 986R	290	98.25% <i>Neofusicoccum parvum</i> (KF766426.1)	98,61% <i>Botryosphaeria parva</i> (CBS 110301)	99,64% <i>Neofusicoccum parvum</i> (CBS122553)
BDA64(9A)	EF1-728F/EF1 986R	292	97.91 % <i>Neofusicoccum parvum</i> (KF766426.1)	98,28% <i>Botryosphaeria parva</i> (CBS 110301)	98,56% <i>Neofusicoccum parvum</i> (CBS122553)
BDA79(11A)	EF1-728F/EF1 986R	373	100% <i>Diaporthe mayteni</i> KC343865.1	71,35% <i>Diaporthe musigena</i> (AB900128)	73,25% <i>Diaporthe ambigua</i> (CBS117374)
CE101	EF1-728F/EF1 986R	507	76.77% <i>Paraconiothyrium hakeae</i> (KY979892.1)	-	-
CED 334	EF1-728F/EF1 986R	296	100.00% <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (KM199518.1)	100% <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (CBS 450.74)	100% <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (CB450.74)
CED 342	EF1-728F/EF1 986R	241	88.61% <i>Clonostachys chloroleuca</i> (KX184988.1)	99,56% <i>Clonostachys sp.</i> (CBS 12475)	99,56% <i>Clonostachys sp.</i> (CBS124754)
CED 432	EF1-728F/EF1 986R	366	82.86% <i>Diaporthe kochmanii</i> (JN645809.1)	83,88% <i>Diaporthe sp</i> (AB900132)	89,37% <i>Diaporthe sp.</i> (AB900132)
CED 371	EF1-728F/EF1 986R	272	97,38% <i>Diaporthe ueckerae</i> (KJ590747.1)	86,99% <i>Diaporthe sp</i> (AB900132)	97,86% <i>Diaporthe absenteum</i> (KP267971)
CED 382	EF1-728F/EF1 986R	-	-	-	-
CED 385	EF1-728F/EF1 986R	301	84.83% <i>Diaporthe masirevicii</i> (KJ197239.1)	85,30% <i>Diaporthe sp</i> (AB900132)	96,99% <i>Diaporthe citri</i> (CBS199.39)
CED409	EF1-728F/EF1 986R	294	100.00% <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (KM199518.1)	100% <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (CBS 450.74)	100% <i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (CBS450.74)
CED 413	EF1-728F/EF1 986R	364	99.71% <i>Diaporthe hongkongensis</i> (KC343845.1)	88,62% <i>Diaporthe musigena</i> (AB900128)	99,71% <i>Diaporthe hongkongensis</i> (CBS1154488)
CED 414	EF1-728F/EF1 986R	365	82.86% <i>Diaporthe kochmanii</i> (JN645809.1)	83,83% <i>Diaporthe sp</i> (AB900132)	92,09% <i>Diaporthe citri</i> (CBS119.39)
CP230	EF1-728F/EF1 986R	300	-	-	não identificou
CP256	EF1-728F/EF1 986R	243	89.03% <i>Clonostachys chloroleuca</i> (KX184988.1)	100% <i>Clonostachys</i> (CBS 124754)	100% <i>Clonostachys sp.</i> (CBS124754)
EP 555	EF1-728F/EF1 986R	328	-	-	não identificou
EP 595	EF1-728F/EF1 986R		-	-	não identificou

EP593	EF1-728F/EF1 986R		-	-	não identificou
EP 650	EF1-728F/EF1 986R	322	97.91% <i>Neofusicoccum parvum</i> (KF766426)	75,33% <i>Neofusicoccum parvum</i> (CBS 122553)	não identificou
EP 652	EF1-728F/EF1 986R	244	89.03% <i>Clonostachys chloroleuca</i> (KX184988.1)	100% <i>Clonostachys</i> (CBS 124754)	100% <i>Clonostachys</i> sp. (CBS124754)
RZ478	EF1-728F/EF1 986R		-	-	85,88% <i>Neopestalotiopsis saprophytica</i> (CBS115452)
RZ 482	EF1-728F/EF1 986R	342	97.07% <i>Fusarium paranaense</i> (KF597797.1)	99,01% <i>Fusarium solani</i> (DQ247163)	99,01% <i>Fusarium solani</i> (DQ247163)
CE 103	EF1-728F/EF1 986R		-	-	não identificou
EP551/1	EF1-728F/EF1 986R		-	-	não identificou
CE101/161	EF1-728F/EF1 986R		-	-	não identificou

3.5. REFERÊNCIAS

ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental conservation**, v. 29, n. 3, p. 331-349, 2002. ISSN 1469-4387.

ARAÚJO, W.; QUECINE, M.; LACAVALA, P.; AGUILAR-VILDOSO, C.; MARCON, J.; LIMA, A.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J. Microorganismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização. **Santarém: UFOPA**, PA, Brazil, 2014.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal biology reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007. ISSN 1749-4613.

ARUNDEL, A.; SAWAYA, D. **The bioeconomy to 2030: Designing a policy agenda**. 2009. Disponível em <<https://www.oecd.org/futures/long-termtechnologicalsocietalchallenges/42837897.pdf>>

AZEVEDO, J.; ARAÚJO, W. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. **Fungi: multifaceted microbes**, v. 1, p. 189-207, 2007.

BATISTA, B. D.; DE ALMEIDA, J. R.; BEZERRA, T. E.; DE AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Describing the Unexplored Microorganisms Associated with Guarana: A Typical Tropical Plant. In: (Ed.). Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics: **Springer**, 2017. p. 293-312.

BEEVER, R.; BOLLARD, E. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. **Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 273-279, 1970. ISSN 1465-208

BENOCCHI, T.; AGUILAR-PONTES, M. V.; ZHOU, M.; SEIBOTH, B.; VRIES, R. P. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 152, 2017. ISSN 1754-6834.

BERRIN, J. G.; NAVARRO, D.; COUTURIER, M.; OLIVE, C.; GRISEL, S.; HAON, M.; TAUSSAC, S.; LECHAT, C.; COURTECUISSÉ, R.; FAVEL, A.; COUTINHO, P. M.; LESAGE-MEESSEN, L. Exploring the natural fungal biodiversity of tropical and temperate forests toward improvement of biomass conversion. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 18, p. 6483-90, Sep 2012. ISSN 0099-2240.

BICKFORD, D., LOHMAN, D. J., SODHI, N. S., NG, P. K., MEIER, R., WINKER, K., ... & DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.

BINOD, P.; GNANSOUNOU, E.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 317-325, 2019. ISSN 2589-014X.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011. ISSN 1537-2197.

BONATELLI, M. L., TSUI, S., MARCON, J., BATISTA, B. D., KITAJIMA, E. W.,

PEREIRA, J. O., QUECINE, M. C. Antagonistic activity of fungi from anthracnose lesions on *Paullinia cupana* against *Colletotrichum* sp. **Journal of Plant Pathology**, p. 197-205, 2016.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2196-2204, 2007. ISSN 1364-5072.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.

CARVALHO, F. B. D. P. Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar por autohidrólise, com ênfase na reutilização de água. **Dissertação Mestrado**. Universidade de Brasília, Instituto de Química, Brasília, DF. 2018.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **J. trop Med. Hyg.**, **70**: 181-184, 1967

CGEE, C. F. S. S. A. M.-. **Second-generation sugarcane bioenergy & biochemicals: Advanced low-carbon fuels for transport and industry**. Brasília: 2017. 124.

CHANDEL, A. K.; ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; CHUNDAWAT, S. P.; PURI, M.; MEIRELES, M. A. A. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2019. ISSN 1932-104X.

CHAVERRI, P. et al. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 558-590, 2015.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Safra 2018/2019, Quarto levantamento, Brasília, abril de 2019. – **Companhia Nacional de Abastecimento** – Brasília: Conab, v.5, n4, p. 1-75 2013. ISSN 2318-7921. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safas/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 06 de maio de 2019.

CORREA, R. C.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; DE SOUZA, C. G.; POLIZELI MDE, L.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, n. 10, p. 1467-78, Oct 2014. ISSN 1367-5435.

COSTA, I. P., MAIA, L. C., CAVALCANTI, M. A. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1165-1173, 2012.

CRUZ, C. D. . Programa Genes - Diversidade Genética. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.

DE FREITAS SIA, E., MARCON, J., LUVIZOTTO, D. M., QUECINE, M. C., TSUI, S., PEREIRA, J. O., AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia*

cupana and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. *SpringerPlus*, 2(1), 579. Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 579, 2013.

DELABONA, PDA, S.; FARINAS, C. S.; DA SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresour Technol**, v. 107, p. 517-21, Mar 2012. ISSN 0960-8524.

DO NASCIMENTO FILHO, F. J.; ATROCH, A. L.; DE SOUSA, N. R.; GARCIA, T. B.; DA SILVA CRAVO, M.; COUTINHO, E. F. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, n. 3, p. 501-506, 2001. ISSN 1678-3921.

ELIAS, L. M. **Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia**. 2015. Universidade de São Paulo.

ELIAS, L. M., FORTKAMP, D., SARTORI, S. B., FERREIRA, M. C., GOMES, L. H., AZEVEDO, J. L., LIRA, S. P. The potential of compounds isolated from *Xylaria* spp. as antifungal agents against anthracnose. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 840-847, 2018.

ELLILÄ, S.; FONSECA, L.; UCHIMA, C.; COTA, J.; GOLDMAN, G. H.; SALOHEIMO, M.; SACON, V.; SIIKA-AHO, M. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 30, 2017. ISSN 1754-6834.

EUROPEAN COMMISSION. **A sustainable bioeconomy for Europe: strengthening the connection between economy, society and the environment** - Updated Bioeconomy Strategy, 2018 Disponível em https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/pdf/ec_bioeconomy_strategy_2018.pdf.

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Ufam e Esalq pesquisam o guaraná 2010. **FAPESP na mídia**. < <http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/38668/ufam-esalq-pesquisam-guarana/>>

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª edição. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, 2010.

FAVARO, L. D. L.; POLETTO, C. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, p. 35-79, 2013.

FERREIRA, J. A.; MAHBOUBI, A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresour technology**, v. 215, p. 334-345, 2016. ISSN 0960-8524.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. DESAFIOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. **Química Nova**, v. 40, p. 1082-1093, 2017. ISSN 0100-

4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422017000901082&nrm=iso>.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.

GEISER, D. M.; DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO, M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying Fusarium. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004. ISSN 0929-1873.

GIBSON, D. M.; KING, B. C.; HAYES, M. L.; BERGSTROM, G. C. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 3, p. 264-270, 2011. ISSN 1369-5274.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995. ISSN 0099-2240.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T. ., SOUTO-MAIOR, A. M. , ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, 2017. ISSN 2165-0497.

HIBBETT D, ABARENKOV K, KOŁJALG U, OŃ PIK M, CHAI B, COLE J, WANG Q, CROUS P, ROBERT V, HELGASON T, HERR JR (2016) Sequence based classification and identification of fungi. **Mycologia** 108:1049–1068.

HONG, S.-B.; GO, S.-J.; SHIN, H.-D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1316-1329, 2005. ISSN 0027-5514.

ICMBio – INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, **Atlas dos manguezais do Brasil**. 2018. Disponível em:<<http://www.icmbio.gov.br>>.

JAIN, L.; AGRAWAL, D. Rational approach for mutant selection of *Talaromyces verruculosus* IPC 324 secreting biofuel cellulases—Assessing saccharification potential. **Industrial crops and products**, v. 114, p. 93-97, 2018. ISSN 0926-6690.

JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 2, p. 164-174, 2016. ISSN 1932-1031.

KING, B. C.; WAXMAN, K. D.; NENNI, N. V.; WALKER, L. P.; BERGSTROM, G. C.; GIBSON, D. M. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 4, 2011. ISSN 1754-6834.

KOVÁCS, K.; MEGYERI, L.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 1, p. 48-55, 2008. ISSN 0141-0229. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022908000628> >.

KUBICEK, C. P. The Actors: Plant Biomass Degradation by Fungi. In: (Ed.). *Fungi and Lignocellulosic Biomass*: **Wiley-Blackwell**, 2012. p. 29-44. ISBN 9781118414514.

LI, J. L., SUN, X., CHEN, L., GUO, L. D. Community structure of endophytic fungi of four mangrove species in Southern China. **Mycology**, v. 7, n. 4, p. 180-190, 2016.

LIU, Z.-H.; CHEN, H.-Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading. **Bioresource technology**, v. 201, p. 15-26, 2016. ISSN 0960-8524.

LONGONI, P.; RODOLFI, M.; PANTALEONI, L.; DORIA, E.; CONCIA, L.; PICCO, A. M.; CELLA, R. Functional analysis of the degradation of cellulosic substrates by a *Chaetomium globosum* endophytic isolate. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 10, p. 3693-705, May 2012. ISSN 0099-2240.

MANDELS, M.; WEBER, J. Cellulases and their applications. **Advances in chemistry series**, v. 95, p. 391, 1969.

MAROLDI, M. M. C.; VASCONCELLOS, V. M.; LACAVA, P. T.; FARINAS, C. S. Potential of Mangrove-Associated Endophytic Fungi for Production of Carbohydrases with High Saccharification Efficiency. **Appl Biochem Biotechnol**, Sep 2 2017. ISSN 0273-2289.

MARQUES, N. P.; DE CASSIA PEREIRA, J.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial crops and products**, v. 122, p. 66-75, 2018. ISSN 0926-6690.

MILLER, G. L. Utilização de reagente para a determinação de ácido dinitrossalicílico de açúcares redutores. **Analitycal Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

ØSTERGAARD, L. H.; OLSEN, H. S. Industrial applications of fungal enzymes. In: (Ed.). *Industrial Applications*: **Springer**, p.269-290, 2011.

PANDEY, A.; HÖFER, R.; TAHERZADEH, M.; NAMPOOTHIRI, M.; LARROCHE, C. **Industrial biorefineries and white biotechnology**. Elsevier, 2015. ISBN 0444634649.

PANSA, C. C. *Trichoderma spp.* de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas celulolíticas. 2017. Universidade de São Paulo.

POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal diversity**, 1999.

PONTECORVO, ROPER, J.; CHEMMONS, L.; MACDONALD, K.; BUFTON, A. The genetics of *Aspergillus nidulans*. In: **Advances in genetics**. Academic Press, 1953. p. 141-238.

PROMPUTTHA, I., HYDE, K. D., MCKENZIE, E. H., PEBERDY, J. F., & LUMYONG, S. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 89-99, 2010.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 17-20, Jan. 1985.

RAVALASON, H.; GRISEL, S.; CHEVRET, D.; FAVEL, A.; BERRIN, J.-G.; SIGOILLOT, J.-C.; HERPOËL-GIMBERT, I. *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 114, p. 589-596, 2012. ISSN 0960-8524.

ROBL, D.; DELABONA, P. D. S.; MERGEL, C. M.; ROJAS, J. D.; COSTA, P. D. S.; PIMENTEL, I. C.; VICENTE, V. A.; DA CRUZ PRADELLA, J. G.; PADILLA, G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 94, October 31 2013. ISSN 1472-6750. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-94> >.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014. ISSN 0166-0616.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005. ISSN 1469-8102.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SEBASTIANES, F. L. S.; DE AZEVEDO, J. L.; LACAVA, P. T. Diversity and biotechnological potential of endophytic microorganisms associated with tropical mangrove forests. In: (Ed.). *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*: **Springer**, 2017. p. 37-56.

SENGUPTA, A.; ZABALA, A.; TAN, S. Y.; BROADSTOCK, A.; SURYANARAYANAN, T. S.; GOPALAN, V. Characterization of an ionic liquid-tolerant beta-xylosidase from a marine-derived fungal endophyte. **Biochem Cell Biol**, v. 95, n. 5, p. 585-591, Oct 2017. ISSN 0829-8211.

SEPPÄLÄ, S.; KNOP, D.; SOLOMON, K. V.; O'MALLEY, M. A. The importance of sourcing enzymes from non-conventional fungi for metabolic engineering and biomass breakdown. **Metabolic engineering**, v. 44, p. 45-59, 2017. ISSN 1096-7176.

SMITH, D.; MCCLUSKEY, K.; STACKEBRANDT, E. Investment into the future of microbial resources: culture collection funding models and BRC business plans for biological resource centres. **Springerplus**, v. 3, n. 1, p. 81, 2014. ISSN 2193-1801.

SORENSEN, A.; TELLER, P. J.; LUBECK, P. S.; AHRING, B. K. Onsite enzyme production during bioethanol production from biomass: screening for suitable fungal strains. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 164, n. 7, p. 1058-70, Aug 2011. ISSN 0273-2289.

SOUSA, G. P. Caracterização molecular e enzimática de fungos endofíticos de cana-de-açúcar e seu potencial para desconstrução de biomassa lignocelulósica. 2017.

SOUZA, M.; GONÇALVES, H.; FERNANDES, O.; BON, E.; SILVA, A. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos filamentosos isolados da Amazônia: seleção de uma linhagem promissora. **SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOSSINAFERM**, v. 18, 2011.

SURYANARAYANAN, T. S.; GOPALAN, V.; SHAANKER, R. U.; SENGUPTA, A.; RAVIKANTH, G. Translating endophyte research to applications: prospects and challenges. In: (Ed.). Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics: **Springer**, p.343-365, 2017.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; GOPALAN, V. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 19-30, 2012. ISSN 1560-2745.

THANH, V. N.; THUY, N. T.; HUONG, H. T. T.; HIEN, D. D.; HANG, D. T. M.; ANH, D. T. K.; HÜTTNER, S.; LARSBRINK, J.; OLSSON, L. Surveying of acid-tolerant thermophilic lignocellulolytic fungi in Vietnam reveals surprisingly high genetic diversity. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 3674, 2019. ISSN 2045-2322.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109472, 2020. ISSN 1364-0321.

UNITED NATIONS. Goal 13: **Take urgent action to combat climate change and its impacts**. Disponível em <<https://www.un.org/sustainabledevelopment/climate-change-2/>>.

USA. **Federal Activities Report on the Bioeconomy**, 2016. Disponível em <https://www.biomassboard.gov/pdfs/farb_2_18_16.pdf>.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, p.452-481, 2006.

4. PRODUÇÃO RECOMBINANTE DAS β -EXPANSINAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SacEXP49 E SacEXP82 E SUA APLICAÇÃO PARA MODIFICAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DA CELULOSE

Resumo

A cana-de-açúcar (*Saccharum*) é considerada uma das matérias-primas mais promissoras para o desenvolvimento da bioeconomia no Brasil. A disponibilidade de sequências genômicas completas dessa planta tem facilitado a descoberta e caracterização funcional de genes de interesse, não somente visando o aumento da produtividade e qualidade dessa cultura, mas também para avaliação do potencial biotecnológico de suas proteínas para aplicações diversas. As expansinas são proteínas encontradas em diferentes organismos e especialmente em plantas. Elas estão envolvidas em vários processos e atuam no rompimento das ligações não covalentes entre as microfibrilas de celulose por um mecanismo não enzimático, levando ao afrouxamento e extensão da fibra. Devido a essas características, elas são consideradas candidatas para uso em diferentes aplicações. Não somente na sacarificação enzimática de biomassa lignocelulósica (o afrouxamento das fibras de celulose pelas expansinas pode facilitar o acesso das celulasas às microfibrilas), mas também para modificação das propriedades físicas da celulose. Embora existam métodos disponíveis para extração de expansinas de tecidos vegetais, a desvantagem desses métodos é que as expansinas são isoladas em pequenas quantidades. Além disso, são necessárias várias etapas de trabalho e purificação, o que dificulta o uso de tais métodos para extração em larga escala. Assim, há uma grande necessidade por meios e métodos que viabilizem a produção recombinante de expansinas de plantas em microrganismos em quantidade suficiente para aplicações diversas. O grupo de pesquisa ao qual este trabalho está vinculado tem se dedicado ao estudo de expansinas da cana-de-açúcar e sua aplicação biotecnológica. Até o momento foram identificados mais de 92 genes diferentes de expansinas no genoma da cana-de-açúcar e sua expressão tem sido avaliada pelo grupo em diferentes partes da planta. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo dar continuidade às pesquisas sobre expansinas de cana-de-açúcar. Especificamente, duas β -expansinas previamente identificadas por apresentarem especificidade de atuação no colmo de plantas adultas (SacEXP49 e SacEXP82) foram expressas com sucesso na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* X-33 e alguns aspectos básicos de sua função foram investigados. Diferentes análises foram realizadas com as β -expansinas recombinantes, incluindo ensaio de ligação à celulose microcristalina, determinação da resistência à tração de papel filtro tratado com as expansinas recombinantes e testes de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por método organosolv, utilizando celulasas comerciais. Os resultados mostraram que as expansinas recombinantes foram secretadas no sobrenadante das culturas e apresentaram alterações pós-traducionais. A identidade das proteínas secretadas foi confirmada por análise proteômica baseada em espectrometria de massas. Estas expansinas recombinantes foram capazes de se ligar à celulose microcristalina (Avicel PH-101) preferencialmente a 30°C e não apresentaram atividade hidrolítica sobre papel filtro. As β -expansinas recombinantes não tiveram efeito sinérgico com celulasas na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado pelo processo organosolv nas condições experimentais utilizadas (baixa carga enzimática e temperatura de 30°C). No entanto, o extrato proteico concentrado e dialisado contendo as β -expansinas recombinantes foram capazes de reduzir acentuadamente a resistência à tração do papel filtro em pH 4,8 e 30°C.

Palavras-chave: *Saccharum*, β -expansina, expressão heteróloga, *Komagataella phaffii*, força tênsil, papel filtro, bagaço, organosolv, proteína recombinante.

4. RECOMBINANT PRODUCTION OF THE SACEXP49 AND SACEXP82 SUGARCANE B-EXPANSINS AND THEIR APPLICATION TO MODIFY THE PHYSICAL PROPERTIES OF CELLULOSE

Abstract

Sugarcane (*Saccharum*) is considered one of the most promising raw materials for the development of the bioeconomy in Brazil. The availability of complete genomic sequences of this plant has facilitated the discovery and functional characterization of genes of interest, not only aiming the increase of productivity and quality this culture, but also to evaluation of biotechnological potential from its proteins for various applications. Expansins are proteins found in different organisms and especially in plants. They are involved in various processes and act in the disruption of non-covalent bonds between cellulose microfibrils by a non-enzymatic mechanism, leading to fiber loosening and extension. Due to these characteristics, they are considered candidates for use in different applications. Not only in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass (the loosening of cellulose fibers by expansins can facilitate cellulases' access to microfibrils) but also to modification of the cellulose physical properties. Although there are methods available for extracting plant tissue expansins, the disadvantage of these methods is that expansins are isolated in small quantities. Besides, are necessary various work steps and purification, making it difficult the use of such methods for large-scale extraction. Thus, there is a great need for means and methods that enable the recombinant production of plant expansins in microorganisms in sufficient quantity for diverse applications. The research group to which this work is linked has been dedicated to the study of sugarcane expansins and its biotechnological application. To date more than 92 different expansin genes have been identified in the sugarcane genome and their expression has been evaluated by the group in different parts of the plant. In this context, the present work had as objective to continue the research about sugarcane expansins. Specifically, two previously identified β -expansins for present action specificity in the stem of adult plants (SacEXP49 and SacEXP82) were successfully expressed in *Pichia pastoris* X-33, and some basic aspects of its function were investigated. Different analyses were performed with recombinant β -expansins, including microcrystalline cellulose binding assay, determination of tensile strength of recombinant expansin-treated filter paper and organosolv-pretreated sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis tests, using commercial cellulases. The results showed that recombinant expansins were secreted in the culture supernatant and present post-translational changes. The identity of the secreted proteins was confirmed by proteomic analysis based on mass spectrometry. These recombinant expansins were capable of binding to microcrystalline cellulose (Avicel PH-101) preferably at 30°C and showed no hydrolytic activity on filter paper. Recombinant β -expansins no had synergistic effect with cellulases on the hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by the organosolv process under the experimental conditions used (low enzymatic load and temperature of 30°C). However, concentrated and dialyzed protein extract containing recombinant β -expansins were able to reduce markedly the tensile strength of the filter paper at pH 4.8 and 30 ° C.

Keywords: *Saccharum*, β -expansin, heterologous expression, *Komagataella phaffii*, tensile strength, filter paper, bagasse, organosolv, recombinant protein.

4.1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a relevância da indústria na produção e transformação de recursos renováveis como cana-de-açúcar, florestas para papel e celulose, e culturas agrícolas, conferem ao país uma oportunidade de ter uma forte atuação na bioeconomia mundial (CGEE, 2016). A cana-de-açúcar é considerada uma das matérias-primas mais promissoras para o desenvolvimento da bioeconomia no Brasil (CNI, 2014; CGEE, 2016). É considerada a principal biomassa para o desenvolvimento de biorrefinarias de lignocelulose, não apenas para a conhecida produção de etanol, açúcar, bioeletricidade, para alimentação animal em propriedades de pequeno, médio e grande porte, mas também para a obtenção de diversos produtos (CONAB, 2019). Por exemplo, a produção de papel e celulose a partir da palha da cana já é uma realidade no Estado de São Paulo (ZAPAROLLI, 2018). Ácidos orgânicos, bioplásticos, compostos bioativos, pigmentos, enzimas e agroquímicos são e/ou podem ser obtidos a partir da conversão dos açúcares do caldo ou da biomassa (bagaço e palha), bem como da conversão dos subprodutos como vinhaça e torta de filtro, usando processos químicos ou rotas bioquímicas, fomentando o desenvolvimento de modelos de biorrefinarias integradas e a economia circular.

As expansinas são proteínas não hidrolíticas encontradas na parede celular das plantas (MCQUEEN-MASON et al., 1992; COSGROVE, 2000). Elas rompem as ligações não covalentes entre as microfibrilas de celulose e entre essas e os demais polímeros da matriz por um mecanismo não enzimático, levando ao afrouxamento e extensão da parede celular (MCQUEEN-MASON & COSGROVE, 1994; SAMPEDRO & COSGROVE, 2005; COSGROVE, 2015). As expansinas estão envolvidas em diferentes respostas fisiológicas, como crescimento de folhas e caule, abertura e fechamento de estômatos, reprodução, amadurecimento, interações simbióticas (do mutualismo ao parasitismo), tolerância à estresses abióticos e bióticos, e outros processos nos quais ocorrem modificações da parede celular (COSGROVE, 2015; MAROWA et al., 2016; SANTIAGO et al., 2018). Proteínas semelhantes às expansinas de plantas são encontradas em bactérias, fungos e outros organismos (nemátodos, moluscos, amebas, vírus) e são denominadas *expansinas-like* (p. ex.: *swollenin*; *loosenin*; *cerato-platanin*). Nestes organismos, as funções das *expansinas-like* são ainda pouco compreendidas e estão relacionadas a diferentes aspectos da biologia das espécies (KENDE et al., 2004; FÁVARO & POLETTO, 2013; CHASE et al., 2019).

Uma mesma planta pode apresentar dezenas a centenas de genes codificadores de expansinas de diferentes subfamílias, com características bioquímicas (pH e temperatura ótimas), especificidades de substrato e formas de atuação distintas. Por exemplo, as plantas

possuem genes codificadores de pelo menos quatro subfamílias de expansinas: α -expansina (EXPA), β -expansina (EXPB), expansin-like A (EXLA) e expansin-like B (EXLB). Estas proteínas contêm entre 225 a 300 aminoácidos divididos entre dois domínios e um peptídeo sinal. O domínio N-terminal (I) possui dobramento do tipo DPBB (*double psi β barrel*) com similaridade estrutural às proteínas da família 45 de glicosil hidrolases (*glycoside hydrolases - GH45*), tais como as β -1,4-endoglicanases (SAMPEDRO & COSGROVE, 2005). Apesar desta semelhança estrutural, as expansinas não possuem a atividade de β -1,4-glicanase das enzimas GH45, que por sua vez não possuem a atividade de extensão de parede celular das expansinas (YENNAWAR et al., 2006). O domínio II na região C-terminal apresenta homologia às proteínas denominadas *group 2 pollen allergens*. Este domínio contém aminoácidos aromáticos conservados e importantes para a ligação à polissacarídeos e se assemelha ao módulo de ligação a carboidrato da família 63 (*carbohydrate binding module - CBM63*) (GEORGELIS et al., 2012; COSGROVE, 2015).

Devido às suas características, as expansinas e as expansinas-like têm sido avaliadas para diferentes aplicações. Por exemplo, seu estudo tem sido voltado principalmente para aplicação como um aditivo na sacarificação enzimática da celulose presente em biomassas lignocelulósicas. Nas biorrefinarias de lignocelulose é necessária a utilização de um pré-tratamento efetivo seguido da adição de elevada carga de enzimas lignocelulolíticas para sobrepor fatores limitantes do substrato e dos coquetéis enzimáticos, que dificultam a hidrólise da fração celulósica da biomassa (ARANTES & SADDLER, 2010). Assim, foi proposto que o afrouxamento de microfibrilas de celulose pela ação de proteínas não hidrolíticas (expansinas e expansinas-like) pode facilitar o acesso das enzimas hidrolíticas às fibras, aumentando a área superficial disponível para a ação enzimática e tornando a sacarificação mais eficiente (COSGROVE et al., 1998; BAKER et al., 2000; COSGROVE, 2001; ARANTES & SADDLER, 2010; LIU et al., 2015; GEORGELIS et al., 2015).

Além da já conhecida aplicação como um aditivo na sacarificação enzimática de componentes da biomassa lignocelulósica, as expansinas de plantas e as expansinas-like de outros organismos têm potencial para uso em diferentes processos onde o afrouxamento de microfibrilas de celulose ou modificações das propriedades físicas e químicas da celulose sejam necessárias: **i**) Indústria de papel: para obtenção de polpa de celulose (COSGROVE, 2001; PERE et al., 2006); para reciclagem de papel (LIAN-CHAO & COSGROVE, 2004); para obtenção de produtos de papel com propriedades físico-químicas distintas (maior volume, maciez, suavidade, melhor adsorção de aditivos amaciadores) feitos a partir das fibras tratadas com expansinas (Documento CN103866604A); para modificar as fibras da polpa e aumentar a

taxa de absorção de água de folhas de papel fabricadas com a polpa tratada com expansinas (MA & TAUSCHE, 2013); e para enfraquecer ou diminuir a resistência mecânica das fibras do papel (Documento JPH08510728A). **ii)** Indústria têxtil: para melhor impregnação de corantes nas fibras (COSGROVE; TAKEDA, 2007); para fabricação, tratamento e acabamento de têxteis à base de celulose (BERENDES et al., 2001). **iii)** Indústria de alimentos e rações animais: como uma tecnologia para aumentar o desempenho de utilização das fibras ou a fermentação ruminal (LI et al., 2019; ADESOGAN et al., 2019).

Além da atuação sobre celulose, a ação sinérgica durante a degradação enzimática de outros polissacarídeos (tais como pectina e xilana) também já foi demonstrada para algumas expansinas de plantas (WEI et al., 2010) e expansinas-*like* de fungos (GOURLAY et al., 2013; SANTOS et al., 2017). Sinergismo com quitinases na degradação enzimática de quitina foi observado para algumas expansinas-*like* de fungos (TOVAR-HERRERA et al., 2015). Esse efeito sinérgico é de grande interesse dada a relevância da quitina e da quitosana para diversas aplicações biotecnológicas (DUTTA et al., 2004); tal efeito também representa um indicativo de possível aplicação como um bioproduto com ação antifúngica.

A eliciação/estimulação de respostas de defesa das plantas contra estresses bióticos foi demonstrada para algumas expansinas-*like* secretadas por fungos mutualistas (BROTMAN et al., 2008) e fungos fitopatogênicos (QUARANTIN et al., 2019). A obtenção de plantas geneticamente modificadas com alterações na expressão de expansinas específicas é uma estratégia promissora para o melhoramento genético de características relacionadas ao desenvolvimento vegetal e à tolerância a estresses bióticos e abióticos (LI et al., 2011; COSGROVE, 2015; MAROWA et al., 2016), ou mesmo para serem utilizadas como biofábricas para produção dessas proteínas (VERMA et al., 2010; YOON et al., 2016).

Outras aplicações das expansinas e das expansinas-*like* podem ser preditas em função do seu modo de ação, mas ainda carecem de comprovações: seu uso como aditivo para aumentar a eficiência de obtenção de protoplastos de células vegetais (ou de células fúngicas, no caso de expansinas-*like* que atuam sobre a quitina); nas diferentes etapas de processamento de fibras têxteis ou tecidos; em diferentes etapas de processamento da polpa de celulose na indústria de papel e na obtenção de papéis com novas características demandadas pelo consumidor; para facilitar a extração de óleos essenciais ou metabólitos bioativos de diferentes tipos de biomassas ou resíduos agroindustriais; entre outros usos na agricultura, agroindústria e indústria química baseada em celulose (obtenção de nanocelulose e nanofibras a partir de diferentes matérias-primas, gomas, espessantes, entre outros produtos).

Apesar dos esforços para caracterização bioquímica de expansinas de plantas, o

número de expansinas-*like* microbianas caracterizadas é maior em comparação com as plantas, conforme revisões de Georgelis et al. (2015), Liu et al. (2015), Martinez-Anaya (2016) e Cosgrove (2017). Exemplos de expansinas de plantas caracterizadas quanto à sua ação sinérgica com celulases durante a hidrólise de celulose incluem expansinas extraídas de diferentes partes de plantas de milho (*Zea mays*) e de outras gramíneas (BAKER et al., 2000; COSGROVE & MCQUEEN-MASON, 1999; COSGROVE, 2001), de pepino, produzida heterologamente por sementes transgênicas de milho (YOON et al., 2016), de arroz, produzidas por *Escherichia coli* (SEKI et al., 2015), e de tomate, produzida por *P. pastoris* (*K. phaffii*) (LIU et al., 2014). A escassez de estudos sobre expansinas de plantas se deve em parte à dificuldade de produzi-las em hospedeiros heterólogos na sua forma funcional e em quantidades necessárias para purificação, investigação bioquímica, e aplicações industriais (KERFF et al., 2008; LIU et al., 2015; YOON et al., 2016).

Embora existam métodos disponíveis para extração de expansinas de tecidos vegetais (COSGROVE & MCQUEEN-MASON, 1999; COSGROVE, 2001; MA & TAUSCHE, 2013; Documento JPH08510728A), a desvantagem desses métodos é que as expansinas são isoladas em pequenas quantidades. Além disso, são necessárias várias etapas de trabalho e purificação, o que dificulta o uso de tais métodos para extração em larga escala. Assim, há uma grande necessidade por meios e métodos que viabilizem a produção recombinante de expansinas de plantas em microrganismos em quantidade suficiente para aplicações diversas. Até o momento não há expansinas de plantas comerciais, seja na sua forma nativa ou recombinante. De fato, a única expansina disponível comercialmente é a expansina-*like* EXLX1 da bactéria *Bacillus subtilis*, produzida de forma recombinante por *E. coli* para uso exclusivo em pesquisa, e distribuída nos EUA pela Lucigen Corporation (Middleton, WI - N0.30502-1).

No caso das expansinas de cana-de-açúcar, estudos anteriores baseados na análise de sequências de bibliotecas de cDNA ou na análise de dados de RNA revelaram que expansinas de famílias distintas são diferencialmente expressas dependendo da idade e do tecido da planta (LIMA et al., 2001; CASU et al., 2007; MATTIELLO et al., 2015; GONÇALVES, 2017). O grande número de genes codificadores de expansinas em diferentes espécies vegetais (monocotiledôneas e dicotiledôneas) levanta questões intrigantes sobre a função dessas proteínas e o significado de sua redundância no genoma das plantas. De fato, determinar o padrão e o controle da expressão gênica é o primeiro passo para elucidar a função de expansinas individuais (LEE & KENDE, 2002).

À luz disso, o grupo de pesquisa ao qual este trabalho está vinculado estudou esse assunto. Por exemplo, Pereira et al. (2017) identificaram e validaram (utilizando a

metodologia de PCR em tempo real) três genes de expansinas com expressão preferencial em colmos de plantas adultas (oito meses; ponto de colheita) de cana-de-açúcar da cultivar RB867515. As expansinas que tiveram a expressão gênica validada foram uma α -expansina e duas β -expansinas (denominadas SacEXP49 e SacEXP82). Especificamente, verificou-se que essas duas β -expansinas não foram expressas nas folhas de plantas adultas da cultivar RB867515, o que revela sua especificidade de atuação apenas em colmo de plantas adultas em ponto de colheita (PEREIRA et al., 2017). Em outro estudo, Santiago et al. (2018) identificaram pelo menos 92 genes diferentes codificadores de expansinas no genoma da cana-de-açúcar (variedade SP80-3280). A expressão desses 92 genes foi avaliada por meio de análise transcriptômica (RNA-seq). Sua expressão é dependente do tecido e da idade das plantas, sendo que genes com expressão preferencial em folhas de plantas jovens (60 dias) de cana-de-açúcar foram identificados. Em conjunto, esses estudos abrem a possibilidade de usar uma estratégia racional baseada em dados de expressão gênica para selecionar e caracterizar as expansinas da cana em termos de seu potencial biotecnológico, seja para investigá-las como um aditivo para aumentar a eficiência da sacarificação enzimática da biomassa da própria cana, ou como um bioproduto renovável para aplicações que dependem de modificação das propriedades físicas da celulose.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo dar continuidade às pesquisas sobre expansinas de cana-de-açúcar. Especificamente, duas β -expansinas previamente identificadas por apresentarem especificidade de atuação no colmo de plantas adultas (SacEXP49 e SacEXP82) foram expressas com sucesso em *P. pastoris* (*K. phaffii*) e alguns aspectos básicos de sua função foram investigados. Diferentes análises foram realizadas com as β -expansinas recombinantes, incluindo ensaio de ligação à celulose microcristalina, determinação da resistência à tração de papel filtro tratado com as expansinas recombinantes e testes de hidrólise enzimática de papel filtro e de bagaço de cana pré-tratado por método organosolv, utilizando celulasas comerciais. Os resultados são discutidos para indicar a melhor aplicação das β -expansinas recombinantes de cana-de-açúcar SacEXP49 e SacEXP82 de acordo com suas características.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Modificação genética de *P. pastoris* X-33 para produção das β -expansinas de cana-de-açúcar SacEXP49 e SacEXP82

Seleção, síntese e clonagem de genes em vetor de expressão de P. pastoris

Dois genes codificadores de β -expansinas de cana-de-açúcar (SacEXP49 e SacEXP82) foram selecionados para análise com base em resultados prévios obtidos pelo grupo de pesquisa ao qual este trabalho está vinculado (PEREIRA et al., 2017; SANTIAGO et al., 2018). A Tabela 9 apresenta as características destes dois genes. Os genes selecionados foram sintetizados e clonados no vetor de expressão gênica comercial pPICZB (Life Technologies), cujo promotor é o AOX1, induzível por metanol. Esse vetor também contém gene de resistência ao antibiótico zeocina. A construção gênica sintética foi obtida com a sequência codificadora de DNA nativa (sem íntrons; códon nativo), e com o sinal de secreção nativo (peptídeo sinal nativo). Além disso, o códon de parada (*stop codon*) nativo da sequência de cada gene foi mantido. Essa construção permite que a proteína madura secretada pela levedura recombinante não contenha em sua região C-terminal o peptídeo composto pelo epítipo *myc* e cauda de afinidade por histidina (cauda de poli histidina) presente no vetor comercial pPICZB. Os plasmídeos recombinantes sintetizados (pPICZB_SacEXP49 e pPICZB_SacEXP82) foram recebidos da GenOne (Brasil) na forma liofilizada, contendo 2 μ g de DNA. Esse material foi ressuscitado em 20 μ L de água ultrapura estéril livre de nucleases e armazenado a uma concentração estoque de 100 ng/ μ L.

Tabela 9. Origem e características das expansinas de cana-de-açúcar selecionados para estudo.

Expansina	Subfamília	Acesso GenBank ^B	Proteína (n° de aa) ^B	Posição peptídeo sinal ^B	Ponto isoelétrico (pI) ^B	Massa molecular proteína secretada	Características
SacEXP82 ^B	β -expansin (EXPB)	MG204125	287 aa	1-26	7,58	29,181 kDa	Expressão preferencial em colmo adulto ^A ; 100% de identidade com SacEXP82
SacEXP49 ^B	β -expansin (EXPB)	MG204121	266 aa	1-26	4,88	26,351 kDa	Expressão preferencial em colmo adulto ^A ; 100% de identidade com SacEXP49

^ADados obtidos por Pereira et al. (2017); os dois transcritos exclusivos de colmo de plantas adultas da cultivar RB867515 identificados por Pereira et al. (2017) possuem 100% de identidade e correspondem às proteínas SacEXP49 e SacEXP82 identificadas por Santiago et al. (2018) no genoma da variedade SP80-3280.

^BDados obtidos por Santiago et al. (2018) a partir da análise de 92 genes codificadores de expansinas do genoma da cultivar comercial SP80-3280.

Transformação de *E. coli* DH10B com os plasmídios pPICZB-SacEXP49 e pPICZB-SacEXP82

Para o preparo de células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes, a cepa foi inoculada em meio LB sólido de modo a obter colônias isoladas (meio LB: 4g de triptona, 2g de extrato de levedura e 4g de NaCl em 400 mL de água destilada). Uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB, seguindo-se incubação a 37°C, 200 rpm por 16-20 horas. Em 200 mL de meio LB foram adicionados 5 mL de pré-inóculo. As células cresceram a 37°C sob agitação (200 rpm) até atingir OD_{600nm} de 0,4-0,6. Após o crescimento, as células foram mantidas em gelo por 30 min e a cultura foi centrifugada a 1500 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de solução gelada de glicerol 10% estéril. As células foram novamente centrifugadas, ressuspensas em 500 µL de glicerol 10% estéril gelado, aliqüotadas (50 µL) em microtubos de 1,5 mL e preservadas em ultrafreezer.

Para cada plasmídeo contendo o gene de interesse foi utilizada uma alíquota de célula eletrocompetente. Dois µL do DNA plasmidial (solução de 10 ng/µL) foram adicionados a 50 µL de célula competente. Cada mistura foi transferida para uma cubeta e a eletroporação foi realizada (Pre-set Protocol para *E. coli*: 1mm, 1,8 KV com 1,8kV, 200Ω e 25µF, Bio-Rad). Imediatamente após o pulso, 800 µL de meio de cultura SOC (Tabela 10) foram adicionados na cubeta, homogeneizados e transferidos para microtubo de 1,5 mL estéril. O microtubo foi incubado a 37°C por 1 hora, sob agitação. O plaqueamento das células foi feito em meio LB Ágar com zeocina (25 µg/mL) espalhando-se as células com alças de Drigalski estéreis. As placas foram incubadas a 37°C por período aproximado de 16 h (SAMBROOK & RUSSELL,2001) e avaliadas quanto à formação de colônias resistentes à zeocina.

Tabela 10. Composição do meio de cultura líquido SOC.

Reagentes	Composição
Triptona	2%
Extrato de levedura	0.5%
Cloreto de sódio (NaCl)	10 mM
Cloreto de potássio (KCl)	2.5 mM
Cloreto de magnésio (MgCl ₂)	10 mM
Glicose	20 mM

Avaliação dos transformantes de *E. coli* DH10B contendo os plasmídios pPICZB-SacEXP49 e pPICZB-SacEXP82

Colônias isoladas de *E. coli* DH10B resistentes à zeocina foram coletadas das placas da transformação e inoculadas em tubos de 15 mL contendo 3 mL de LB e zeocina (25 µg/mL). Após a incubação (37°C, 16 h, 180 rpm), parte da cultura foi preservada em glicerol

30% em ultrafreezer (essa preservação dos transformantes foi realizada misturando-se 375 µL de glicerol 80% e 625 µL de cultura bacteriana). O restante foi centrifugado (1 min, 14.000 rpm) e o sobrenadante foi descartado.

A extração do DNA plasmidial (miniprep) foi realizada conforme a seguir: No microtubo contendo o *pellet* de células previamente centrifugadas foram adicionados 200 µL da Solução I (50 mM de glicose; 250 mM de Tris-HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA pH 8,0). Em seguida foram adicionados 200 µL da Solução II (0,2M de NaOH; 1% de SDS). E por último 200 µL da Solução III (5M de acetato de potássio; 100 mL de ácido acético). Os microtubos foram misturados por inversão (10 vezes) e centrifugados por 10 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL ao qual foram adicionados 420 µL (0,7 do volume) de isopropanol e em seguida centrifugou-se por 15 min e descartou-se o sobrenadante. Posteriormente foram adicionados 200 µL de etanol 70% e os microtubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e deixado na bancada por 30 min para secar completamente. E por fim, ressuspendeu-se o DNA plasmidial em 30 µL de água ultrapura esterilizada, conforme descrito por Sambrook & Russel (2001).

Para confirmar se os plasmídeos pPICZB-SacEXP49 e pPICZB-SacEXP82 continham os genes de interesse, o DNA plasmidial extraído foi analisado quanto ao padrão de restrição, utilizando as enzimas de restrição (New England BioLabs) selecionadas para a síntese das sequências (*EcoRI* na extremidade 5' e *XbaI* na extremidade 3'). As reações de clivagem foram realizadas em volume final de 10 µL, conforme descrito na Tabela 11. Os reagentes foram misturados em microtubos de 1,5 mL e as reações foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas (*overnight*).

Tabela 11. Reações de clivagem com enzima de restrição dos plasmídios pPICZB-SacEXP49 e pPICZB-SacEXP82.

Reagentes	Quantidade
Tampão da enzima - Tango (Promega)	1,0 µL
DNA plasmidial de interesse	2,0 µL
<i>EcoRI</i>	0,4 µL
<i>XbaI</i>	0,4 µL
Água ultrapura esterilizada	6,2 µL

Transformação de P. pastoris X-33 (K. phaffii) com os plasmídeos pPICZB-SacEXP49 e pPICZB-SacEXP82:

Os transformantes de *E. coli* DH10B previamente checados quanto à presença dos plasmídios recombinantes pPICZB-SacEXP49 e pPICZB-SacEXP82 foram cultivados em 5 mL de LB contendo zeocina. A extração de DNA plasmidial foi realizada com *PureYieldTM*

Plasmid Miniprep (Promega) para obtenção de quantidade suficiente de plasmídeo para as etapas posteriores; novamente o DNA plasmidial extraído foi checado por análise eletroforética do padrão de restrição com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* (New England BioLabs).

Após a extração dos plasmídeos recombinantes foi realizada a linearização destes vetores. Esta etapa é necessária para que ocorra a integração do gene de interesse no genoma da levedura. A enzima de restrição utilizada para linearizar os plasmídios recombinantes pPICZB-SacEXP49 e pPICZB-SacEXP82 foi *PmeI* (New England BioLabs). A Tabela 12 apresenta a reação utilizada para linearização dos plasmídios recombinantes. Os reagentes foram misturados em tubos de 1,5 mL e as reações foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas (*overnight*).

Tabela 12. Reação de clivagem com enzima de restrição para linearização dos plasmídios pPICZB-SacEXP49 e pPICZB-SacEXP82.

Reagentes	Quantidade
Tampão da enzima de restrição -10X Buffer O- (Thermo Fisher Scientific)	1,0 µL
DNA plasmidial de interesse	2,0 µL (~10 µg)
<i>PmeI</i> 10 U/µL (New England BioLabs)	0,2 µL
Água ultrapura esterilizada	6,8 µL

Para a precipitação foram adicionados 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2,5 X do volume de etanol 100% gelado. O conteúdo foi homogeneizado por inversão e armazenado a -80°C por 1 hora. Depois a mistura foi centrifugada por 15 min a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado por 15 min a 14.000 rpm. Por fim, o conteúdo foi seco e ressuscitado em 50 µL em água ultrapura esterilizada (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

O preparo de células competentes de *P. pastoris* X-33 seguiu protocolo do manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen). Células de *P. pastoris* X-33 foram inoculadas em 10 mL de meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) em frasco de 125 mL e incubadas a 28°C, 250 rpm, por 20 h. As células foram diluídas e verificadas até que a OD_{600nm} estivesse entre 0,1-0,2 em 10 mL de YPD. Uma alíquota de 3 mL foi inoculada em 200 mL de meio YPD. O inóculo foi incubado a 28°C com agitação (250 rpm) até que a OD_{600nm} necessária fosse atingida (1,3-1,5). Após atingir a OD_{600nm} esperada (4 a 6 h), a cultura foi transferida para quatro tubos de 50 mL e incubada em gelo por 30 min para interromper o crescimento. As células foram centrifugadas a 1500 g durante 5 min à 4°C e ressuscitadas em 200 mL de água ultrapura estéril gelada. Outras centrifugações foram realizadas sendo que o pellet foi ressuscitado em 100 mL e na última etapa, em 20 mL de sorbitol 1 mol/L a -20°C. Por fim, as células foram centrifugadas e ressuscitadas em 1 mL

de sorbitol 1 mol/L gelado e imediatamente utilizadas na transformação.

O protocolo para eletroporação de *P. pastoris* X-33 foi baseado no manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen). Para cada transformação, foram adicionados 10 µL do DNA plasmidial linearizado e precipitado com etanol (~10 µg) em 80 µL de célula competente; a mistura foi mantida em gelo por 5 min. As células foram transferidas para cubetas de 0,2 cm também geladas. A eletroporação ocorreu nas seguintes condições: 1500 V, 25 µF, 400 Ω (Bio-Rad). Logo após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 mol/L à cubeta, depois todo o volume foi transferido para um microtubo estéril de 1,5 mL. As células foram incubadas a 28°C, sem agitação, por duas horas. Após a incubação foram plaqueados 100 µL das células em YPDS sólido (*Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol*) com 200 µg/mL de zeocina. O restante foi centrifugado a 3000 g por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de sorbitol 1 mol/L gelado e plaqueadas em YPDS sólido com 200 µg/mL de zeocina. As placas foram incubadas a 30°C por 4 dias para obtenção dos transformantes.

Avaliação de transformantes de *P. pastoris* X-33 por PCR

Para confirmar se os genes de interesse foram integrados no genoma da levedura, o DNA genômico proveniente da lise das leveduras foi diretamente utilizado como molde em reações de PCR. Para tanto, foram utilizados primers específicos que flanqueiam as regiões 5' e 3' do promotor AOX1, o qual é responsável pela maior parte da atividade álcool oxidase da célula. Células transformantes foram diretamente coletadas das placas seletivas contendo os transformantes e inseridas nos tubos contendo o mix de PCR (Tabela 13). Para a amplificação, foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento do primer a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 4 minutos. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos.

Tabela 13. Reação de PCR para confirmação da inserção dos genes de interesse no genoma de *P. pastoris* X-33.

Reagentes	Volume	Concentração final
10X Reaction Buffer (Invitrogen)	10 µL	1X
MgCl ₂ (25 µM e Promega)	3,7 µL	3,7 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 µL	0,2 mM
Primer 5' AOX1 Forward	1,25 µL	0,8 mM
Primer 3' AOX1 Reverse	1,25 µL	0,8 mM
Platinum Taq DNA Polymerase (5U/µL Promega)	0,25 µL	1,0 U
Água ultrapura esterilizada (para 25 µL)	8,6 µL	-
1 transformante	-	-

Os transformantes de *P. pastoris* X-33 confirmados por PCR foram preservados por ultracongelamento (em glicerol 30%) para posterior cultivo e análise de produção das proteínas recombinantes.

4.2.2. Cultivo de transformantes de *P. pastoris* X-33 e análise de perfil proteico via eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os transformantes de *P. pastoris* X-33 confirmados via PCR foram selecionados para cultivo e avaliação do perfil proteico. Para isso, foram realizados experimentos de indução da expressão com metanol usando os meios de cultura Buffered Glycerol / Methanol-complex (BMGY / BMMY), de acordo com as instruções fornecidas pela Invitrogen. Inicialmente, uma colônia isolada de cada transformante foi coletada e inoculada em 25 mL de meio BMGY, em Erlenmeyer estéril de 250 mL. Esta cultura foi incubada a 30°C e 200 rpm, até atingir uma OD_{600nm} de 2 a 6 (aproximadamente 16-18 horas). As células foram então centrifugadas a 1500 x g por 15 min a temperatura ambiente e ressuspensas em 50 mL de meio BMMY. A cada 24 horas, foi adicionado metanol absoluto (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 1%, para manter a indução dos transformantes. Durante a indução, alíquotas de 1 mL foram coletadas (0, 24, 48 e 72 horas). Cada alíquota foi centrifugada a 1500 x g por 15 min e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado a -80°C para posterior análise da expressão das proteínas por SDS-PAGE. O mesmo procedimento foi realizado para a cepa controle *P. pastoris* X-33 transformada com o vetor pPICZB vazio.

Os sobrenadantes coletados durante o cultivo e ao final do período de indução foram analisados em gel de poliacrilamida desnaturante em sistema de eletroforese vertical (Bio-Rad). Para isso, alíquotas de 20 µL do sobrenadante foram misturadas com 20 µL do tampão de amostra β-mercaptoetanol (Tris-HCl 125 mM, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,01% e β-mercaptoetanol 1%). Em seguida, as amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos antes da aplicação no gel para desnaturação das proteínas. Os sobrenadantes foram avaliados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%, conforme Sambrook & Russell (2001). A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X com uma voltagem constante de 160 V. Os reagentes e volumes do gel desnaturante de poliacrilamida 12% foram: **a)** Gel concentrador 4%: Água 3,5 mL; Acrilamida/Bis 30% 650 µL; Tris-HCl 1,0M pH 6,8 1,25 mL; SDS 10% 50 µL; APS 10% 50 µL. **b)** Gel separador 12%: Água 3,6 mL; Acrilamida/Bis 30% 8 mL; Tris-HCl 1,5M pH 8,8 5 mL; SDS 10% 200 µL; e TEMED 8 µL.

Após a corrida, os géis foram incubados no corante Coomassie brilliant blue G-250 (em %: Azul de Coomassie R-250 0,25%; metanol 50%; e ácido acético 10%) por, no

mínimo 12 h em recipiente fechado em mesa com agitação oscilante. Após lavagens sucessivas com solução descorante (em %: metanol 30%, ácido acético 10% e água destilada 60%), as bandas foram visualizadas em transiluminador. Como controle negativo foram usados os sobrenadantes de *P. pastoris* X-33 contendo o vetor de expressão vazio. A proteína LPMO (mono-oxigenase lítica de polissacarídeo) E7 de *Thermobifida fusca* produzida por *P. pastoris* X-33 foi previamente obtida pelo grupo de pesquisa e utilizada como controle interno nas corridas de SDS-PAGE. O marcador de peso molecular utilizado foi o PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 a 250 kDa (Thermo Fisher Scientific).

Os transformantes que secretaram as proteínas recombinantes durante os cultivos e triagens por SDS-PAGE foram selecionados para novo cultivo em maior volume de meio de cultura, visando à obtenção de quantidade suficiente de proteína para análises posteriores.

No caso, foi realizado o cultivo dos transformantes pPICZB_SacEXP82 P4 e pPICZB_SacEXP49 P1. O transformante pPICZB_SacEXP82 P4 foi cultivado em biorreator (Labfors 5 - Infors HT). Inicialmente, o transformante pPICZB_SacEXP82 P4 foi pré-cultivado em 200 mL de meio YPD durante 24 h a 30°C em frascos agitados de 1 L a 250 rpm. As células foram centrifugadas a 1500 x g e inoculadas em biorreator Labfors 5 (3,6 L) (Infors AG, Basileia, Suíça) contendo 2,0 litros de meio mineral (MAURER et al., 2006). A densidade celular inicial foi de 2,0, considerando temperatura de 30°C e pH 5,5 e uma adição constante de 28% de hidróxido de amônio. O meio foi suplementado com glicerol 4%, antiphoam 204 (Sigma-Aldrich), 0,2 g/L de biotina (Sigma-Aldrich) e 4,35 mL de traços de sais PTM1 por litro de solução estoque (PONTE et al., 2016). A concentração de oxigênio dissolvido (dO₂) foi mantida acima de 20% controlando a velocidade do agitador entre 400 e 1200 rpm e o fluxo de ar constante a 1 vvm. A fase de transição de metanol foi iniciada pelo aumento da adição de metanol (1,0 - 5,0 g/L). A alimentação de metanol começou como indicado por uma concentração mais elevada de dO₂, pela adição (em pulsos) de 10 ou 20 g/L de metanol. As amostras foram recuperadas da fermentação para quantificação da concentração de glicerol e metanol, densidade celular e concentração de proteína. Ao final do cultivo, os caldos de fermentação foram centrifugados a 4.500 g durante 30 min para obter sobrenadantes contendo a expansina recombinante SacEXP82.

Para o cultivo do transformante pPICZB_SacEXP49 P1, inicialmente foram inoculados oito frascos, os quais continham 30 mL de BMGY pH 6,0; os frascos foram incubados a 30°C por 24 h com agitação (250 rpm). As células foram então centrifugadas a 1500 g por 10 min e cada *pellet* oriundo das amostras de 30 mL foi inoculado em frasco de 1 L contendo 100 mL de BMMYpH 6,0, para uma OD_{600nm} inicial de 17, produzindo 800 mL

de material final de cultura. Os frascos foram incubados a 250 rpm e 30°C durante 72 h. O metanol foi adicionado a uma concentração final de 1% duas vezes ao dia. O controle negativo (cepa controle transformada com o vetor pPICZB vazio) também foi cultivado nas mesmas condições. Ao final do cultivo, o caldo de fermentação foi centrifugado a 4.500 g durante 30 min para obter sobrenadantes contendo a expansina recombinante SacEXP49.

A concentração de proteína total dos sobrenadantes contendo SacEXP82 e SacEXP49 foi determinada (triplicata) utilizando kit de ensaio de proteína por ácido bicinconínico (BCA) (Sigma-Aldrich), com BSA (Sigma-Aldrich) variando de 0,0625 a 1 mg/mL como padrão. Os sobrenadantes contendo as β -expansinas foram concentrados 20 vezes (SacEXP82) e 35 vezes (SacEXP49) por ultrafiltração utilizando Amicon 400 mL (Millipore) contendo uma membrana biomax de polietersulfona (76 mm) com 10 kDa de corte (Millipore) e dialisada por 5 vezes contra água destilada. As amostras resultantes foram analisadas por SDS-PAGE e a proteína total foi quantificada como já descrito. Os mesmos procedimentos foram realizados com o sobrenadante do cultivo da cepa controle contendo vetor vazio pPICZB. Esses extratos proteicos concentrados e dialisados foram utilizados em diferentes ensaios descritos a seguir.

4.2.3. Identificação de proteínas heterólogas por espectrometria de massas

Os extratos proteicos concentrados e dialisados dos transformantes pPICZB_SacEXP82 P4 e pPICZB_SacEXP49 P1, bem como da cepa de controle (com vetor vazio pPICZB), foram submetidos à análise proteômica baseada em espectrometria de massas. Esta análise foi realizada por empresa terceirizada (GenOne, Brasil).

O extrato proteico concentrado e dialisado do transformante de *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP82 P4 também foi submetido à análise de SDS-PAGE e as principais bandas do gel foram excisadas e também submetidas à análises proteômicas baseadas em espectrometria de massas (GenOne, Brasil). Os dados recebidos foram avaliados com o software Proteome Discoverer v2.1 (Thermo Fisher Scientific) e o mecanismo de pesquisa Sequest HT usou todas as entradas atribuídas a *Saccharum* no banco de dados UniProt.

4.2.4. Ensaio de ligação à celulose microcristalina

A ligação das proteínas recombinantes SacEXP82 e SacEXP49 à celulose microcristalina foi avaliada conforme descrito por Eibinger et al. (2016). Resumidamente, 500 μ L (30 μ g de proteína total) dos extratos proteicos concentrados e dialisados dos transformantes *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP82 P4 e *P. pastoris* X-33

pPICZB_SacEXP49 P1, bem como da cepa de controle (transformada com vetor vazio pPICZB), foram misturados com 50 mg de Avicel PH-101 (Sigma-Aldrich) e tampão citrato de sódio pH 4.8 (concentração final de 50 mM). Os microtubos contendo as misturas foram incubados a 30°C e 50°C, 900 rpm, durante 24 horas (Eppendorf ThermoMixer). Posteriormente, os microtubos foram centrifugados e o sobrenadante (contendo proteínas não ligadas) foi transferido para um novo microtubo. O sedimento remanescente de Avicel foi extensivamente lavado (10 vezes) e as proteínas ligadas à celulose foram eluídas conforme Eibinger et al. (2016). Os perfis protéicos da amostra inicial, bem como das proteínas ligadas e não ligadas à celulose foram avaliados por SDS-PAGE (gel corado com prata) (NESTERENKO et al., 1994). Foi utilizado o marcador molecular Precision Plus Protein™ Dual Xtra (BioRad).

4.2.5. Avaliação da atividade hidrolítica de β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar

Para avaliar se as β -expansinas recombinantes SacEXP82 e SacEXP49 apresentam atividade hidrolítica contra substrato celulósico, os extratos proteicos concentrados e dialisados dos transformantes *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP82 P4 e *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP49 P1 foram submetidos à um ensaio miniaturizado com papel filtro Whatman nº 1. O ensaio foi baseado no método descrito por XIAO et al. (2014). Resumidamente, os discos de papel filtro de 6 mm (2 mg) foram umedecidos com 60 μ L de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8). O extrato proteico concentrado e dialisado foi carregado a 60 μ g em 2 mg / g de substrato. As microplacas de 96 poços contendo as reações foram incubadas a 30°C e 50°C durante 60 min. Açúcares redutores foram determinados usando o método DNS. A atividade da FPase foi calculada com base nos padrões de glicose e expressa em UI / mL.

4.2.6. Efeito das β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar na sacarificação de substratos celulósicos

Neste ensaio, foram avaliados os efeitos dos extratos proteicos concentrados e dialisados contendo β -expansinas recombinantes na sacarificação enzimática de bagaço de cana pré-tratado pelo processo organosolv. O bagaço de cana foi fornecido pela indústria de Açúcar e Álcool S/A Jalles Machado (Goianésia, Goiás, Brasil) e foi pré-tratado pelo processo organosolv na proporção sólido:líquido de 1:6 (p/v) a 180°C por 2 h. A composição

desse bagaço pré-tratado (em %) era de: $61,44 \pm 1,80$ de celulose; $10,92 \pm 0,40$ de hemicelulose; e $9,92 \pm 0,70$ de lignina, conforme determinado pelo método de Gouveia et al. (2009).

O efeito dos extratos proteicos concentrados e dialisados contendo β -expansinas recombinantes foi avaliado de duas maneiras: em um ensaio de pré-tratamento (pré-incubação) no qual os extratos proteicos contendo β -expansinas foram aplicados ao substrato antes das celulases; e em um ensaio simultâneo (denominado “sinergismo”) no qual os extratos proteicos contendo β -expansinas foram misturados com as celulases. A albumina sérica bovina (BSA) foi usada como controle. Os ensaios foram realizados em pH 4,8 (tampão 50 mM de acetato de sódio) e 30°C. Os extratos proteicos concentrados e dialisados contendo β -expansinas (normalizados pela concentração proteica) e a proteína BSA foram carregados a 10 mg/g (proteína/substrato) e a celulase comercial Celluclast 1,5 L (celulase de *Trichoderma reesei*; Sigma-Aldrich C2730) foi carregada a 0,48 FPU/g de substrato (para a hidrólise da biomassa). Os testes foram realizados com 5 mg / mL de bagaço pré-tratado em microtubos de 2 mL incubados em termomisturador (Eppendorf) a 900 rpm.

Nos ensaios de pré-tratamento, o substrato foi incubado com o extrato protéico concentrado e dialisado contendo β -expansinas ou com BSA a 30°C por 24 h. Após a incubação, Cellulast foi adicionada e a reação foi mantida à mesma temperatura por 24 h. Nos ensaios simultâneos, o extrato proteico contendo β -expansinas (ou BSA) foi adicionado em combinação com Celluclast e incubado a 30°C por 24 h.

Após os ensaios de sacarificação, a concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). A análise de variância foi realizada para todos os dados gerados e as diferenças entre as médias foram comparadas com o teste t de Student ($\alpha = 0,05$).

4.2.7. Determinação da resistência à tração e deformação do papel filtro tratado com β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar

O efeito das β -expansinas recombinantes SacEXP82 e SacEXP49 na resistência à tração e deformação do papel filtro tratado com essas proteínas foi avaliado utilizando a Máquina Universal de Ensaio AROTEC WDW-20E. Tiras de papel filtro Whatman nº 3 foram cortadas (2 cm x 7 cm) e incubadas a 30°C e 50°C por 1 hora em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8 e 5,5) contendo 1,2 mg/mL do extrato proteico concentrado e dialisado contendo as expansinas recombinantes. A força tênsil de tiras de papel filtro Whatman nº3 incubadas em tampão acetato de sódio com 1,2 mg/mL de BSA (bovine serum albumin-

Sigma-Aldrich) e tampão acetato de sódio com Uréia 8M também foi avaliada, como controles negativo e positivo, respectivamente.

Após o período de incubação, as tiras de papel foram retiradas da reação e fixadas às garras da Máquina Universal de Ensaio Mecânicos (Marca Arotec, Modelo WDW- 20E) (Figura 23). Todas as medidas de tensão foram realizadas utilizando uma célula de carga de 50 kgf, distância entre garras de 40 mm e velocidade de deslocamento das garras de 0,5 mm/min. Ao menos 5 corpos de prova (repetições) foram utilizados para cada condição e os desvios padrão foram calculados. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

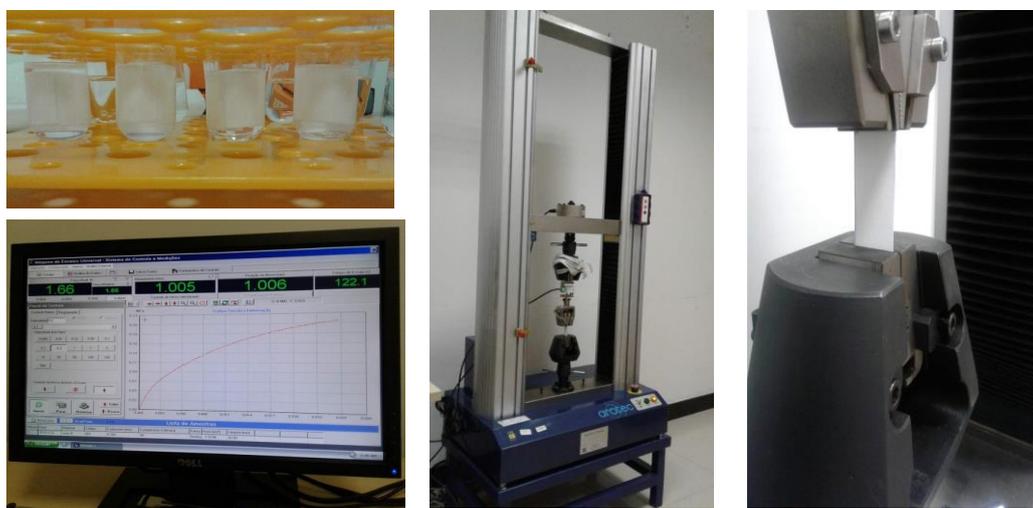


Figura 23. Equipamentos utilizados para realização do ensaio mecânico para determinação da resistência à tração e deformação do papel filtro tratado com β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar. Primeira imagem mostra as amostras incubadas por 30 min a 30°C e 50°C. O computador em que as análises são calculadas quanto à força tênsil, o equipamento Máquina Universal em que foi colocada a tira de papel umedecida pelo extrato proteico contendo a expansina recombinante e a última imagem o papel sendo estendido até sofrer a primeira ruptura.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. *P. pastoris* é um hospedeiro adequado para expressão de β -expansinas da cana-de-açúcar

Neste estudo, duas β -expansinas previamente identificadas por terem especificidade de atuação no colmo de plantas adultas de cana-de-açúcar (SacEXP82 e SacEXP49) foram produzidas com sucesso pela levedura metilotrófica *P. pastoris* X-33 (reclassificada como *K. phaffii*, conforme Kurtzman, 2009). Para explorar o potencial biotecnológico de expansinas de plantas e de expansinas-like de outros organismos, é essencial o uso de um sistema de expressão heteróloga adequado, não apenas para obter alta produção da proteína, mas também para garantir sua expressão em uma forma funcional. *P. pastoris* X-33 já demonstrou ser um sistema versátil de expressão de expansinas-like, de *swollenin* e de *cerato-platanin* (WANG et al., 2014; TOVAR-HERRERA et al., 2015; QUARANTIN et al., 2019) porque as proteínas são secretadas no meio extracelular, o que permite uma recuperação eficiente. Antes do presente trabalho, a única expansina de planta produzida por *P. pastoris* era a α -expansina de tomateiro *LeEXP2* (MA et al., 2011; LIU et al., 2014).

Ao todo foram obtidos dez transformantes de *P. pastoris* X-33 resistentes à zeocina contendo o plasmídeo pPICZB_SacEXP82, os quais foram confirmados por PCR (Figura 24 - A); e cinco transformantes contendo o plasmídeo pPICZB_SacEXP49, dos quais quatro foram confirmados por PCR (Figura 24 - B).

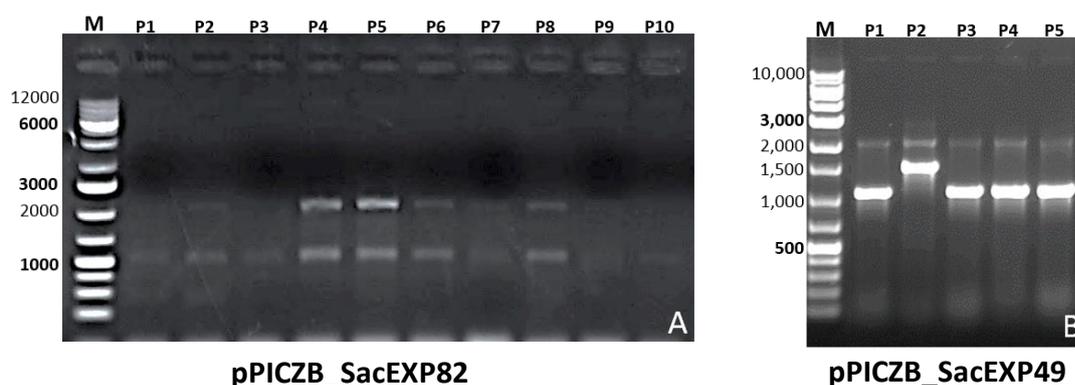


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos para transformantes resistentes à zeocina contendo os plasmídeos recombinantes pPICZB_SacEXP82 e pPICZB_SacEXP49, utilizando os iniciadores 5' AOX1 e 3' AOX1. As amplificações produziram uma banda de aproximadamente 1.200 pb, contendo o gene alvo, e uma banda de aproximadamente 2.200 pb correspondente ao gene AOX1, como esperado. Na Figura A, as linhas P1 - P10 representam transformantes de *P. pastoris* X-33 contendo o plasmídeo pPICZB_SacEXP82. Na Figura B, as Linhas P1 - P5 representam transformantes de *P. pastoris* X-33 contendo pPICZB_SacEXP49. Observe que P2 de pPICZB_SacEXP49 mostra um tamanho diferente que não era esperado (por volta de 1500 pb) e foi descartado da análise.

Os transformantes P1, P2, P4, P5, P6, e P8 (com o vetor pPICZB_SacEXP82) e P1, P3, e P5 (com o vetor pPICZB_SacEX49) foram cultivados em condições indutoras (presença de metanol) em frascos erlenmeyer de modo a selecionar qual deles secretava a proteína no sobrenadante. Após a triagem desses transformantes em condições indutoras foram selecionadas as linhagens *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP82 P4 (produtora da expansina SacEXP82) e *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP49 P1 (produtora da expansina SacEXP49) para continuidade do trabalho. A Figura 25 exemplifica a seleção do transformante pPICZB_SacEXP49 P1.

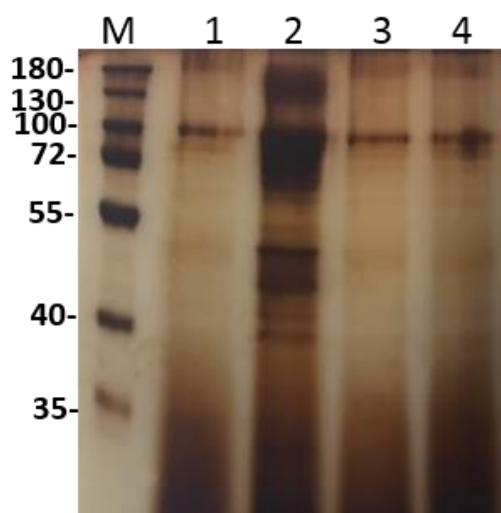


Figura 25. Análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos sobrenadantes dos transformantes de *P. pastoris* X-33 após 72 horas de indução com metanol. Os sobrenadantes dos transformantes P1, P3 e P5 (P4 não cresceu) contendo o plasmídeo recombinante pPICZB_SacEXP49 são mostrados nas canaletas 2 a 4. A canaleta 1 apresenta o sobrenadante da cepa controle de *P. pastoris* X-33 contendo o vetor pPICZB vazio (controle negativo).

Os transformantes selecionados *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP82 P4 e *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP49 P1 foram cultivados em maior escala, sendo que o transformante P4 foi cultivado em biorreator e o transformante P1 foi cultivado em frascos agitados. Após concentração e diálise dos sobrenadantes desses cultivos, o extrato proteico obtido foi submetido à quantificação de proteína total, resultando em 17 mg/mL para o extrato do transformante pPICZB_SacEXP82 P4 e 16 mg/mL para o extrato do transformante pPICZB_SacEXP49 P1. A Figura 26 exemplifica a análise eletroforética das proteínas do extrato protéico concentrado e dialisado oriundo do sobrenadante do cultivo em biorreator do transformante *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP82 P4 e do cultivo em frascos do transformante *P. pastoris* X-33 pPICZB_SacEXP49 P1.

Na Figura 26 é possível observar múltiplas bandas com diferentes massas variando de

aproximadamente 35-37 kDa a 95 kDa no extrato proteico do transformante pPICZB_SacEXP82 P4, e uma banda proeminente de aproximadamente 55 kDa no extrato proteico do transformante pPICZB_SacEXP49 P1, em comparação com o controle. Ou seja, o tamanho das proteínas recombinantes visualizadas no gel é maior do que o tamanho predito das expansinas SacEXP82 e SacEXP49 (a β -expansina SacEXP82 nativa secretada tem 261 aminoácidos e massa molecular estimada de 29.181 kDa e pI teórico de 7,73; enquanto a β -expansina SacEXP49 nativa secretada tem 241 aminoácidos e massa estimada de 26.351 kDa e pI teórico de 4,88). Os resultados indicam a ocorrência de modificação pós-traducional nas proteínas recombinantes secretadas pela levedura *P. pastoris* X-33.

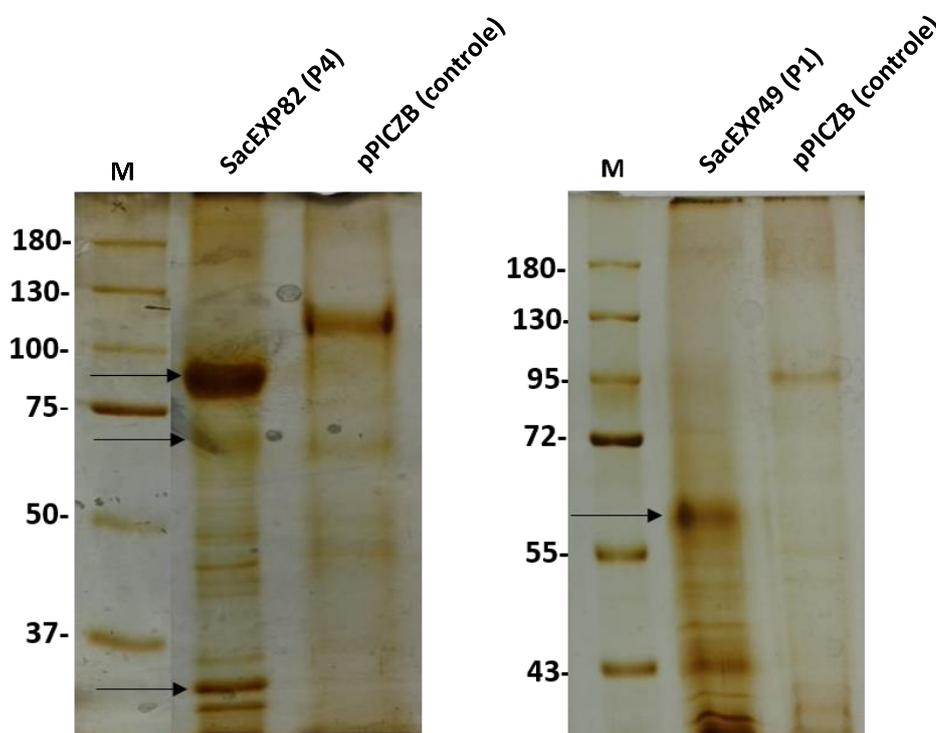


Figura 26. Perfil eletroforético das proteínas do sobrenadante dos cultivos após indução com metanol. A figura da esquerda mostra o sobrenadante do transformante P4 de *P. pastoris* X-33 (pPICZB_SacEXP82) cultivado em biorreator. A figura da direita mostra o sobrenadante do transformante P2 de *P. pastoris* X-33 (pPICZB_SacEXP49) cultivado em frascos cônicos de 1 L. As setas indicam as prováveis proteínas heterólogas secretadas, que não aparecem no controle; e M representa Precision Plus Protein™ Dual Xtra-BIO-RAD Standard.

Isso pode ser possível devido à presença de sítios de glicosilação nessas proteínas. Por exemplo, ambas as sequências de proteínas possuem pelo menos um local putativo de N-glicosilação, como previsto pelo NetNGlyc 1.0 Server (aminoácido N na posição 19, sequência NTSD da proteína SacEXP82; aminoácido N na posição 7, sequência NASD da proteína SacEXP49), enquanto um local putativo de O-glicosilação foi previsto apenas para a

proteína SacEXP49 (aminoácido T na posição 23).

Para confirmação da secreção e da identidade das proteínas recombinantes, além das análises eletroforéticas, foi realizada a análise proteômica de bandas de gel e de extratos proteicos. Para o transformante pPICZB_SacEXP82 P4, a análise de espectrometria de massas foi realizada tanto com as bandas recortadas do gel SDS-PAGE, quanto com o extrato proteico concentrado e dialisado (liofilizado). Para o transformante pPICZB_SacEXP49 P1, a análise foi realizada com o extrato proteico concentrado e dialisado (liofilizado).

A análise das principais bandas de gel (de aproximadamente 95 kDa, 72 kDa, 54 kDa, 50 kDa, e 35-37 kDa) do transformante pPICZB_SacEXP82 P4 expressando a β -expansina SacEXP82 revelou uma alta identidade com a “Expansin 82 de *Saccharum hybrid cultivar*” (accession number A0A2H4YIR5) das bandas de aproximadamente 35-37kDa e 50 kDa, possivelmente correspondendo à mesma proteína com diferentes padrões de modificações pós-traducionais. Também foi verificada elevada identidade com a “Expansina 82” quando o extrato proteicoconcentrado, dialisado e liofilizado desse mesmo transformante foi avaliado.

A análise de espectrometria de massas do extrato proteico concentrado, dialisado e liofilizado do transformante pPICZB_SacEXP49P1 produtor da β -expansina SacEXP49 revelou identidade com peptídeos de diferentes β -expansinas do genoma da cana-de-açúcar da base de dados UniProtKB, com diferentes percentagens de cobertura (p. ex.: EXP74, EXP29, EXP22, EXP32, EXP54, EXP3). Nenhuma expansina foi identificada no secretoma da cepa controle *P. pastoris* X-33 contendo o vetor vazio pPICZB (dados não mostrados). Todos esses resultados confirmam que os dois transformantes de *P. pastoris* X-33 selecionados secretam as β -expansinas de cana-de-açúcar recombinantes SacEXP82 e SacEXP49.

Na literatura, não são frequentes os casos de sucesso de produção heteróloga de expansinas de plantas. Por exemplo: as proteínas GR2 de milho (*Z. mays*) (*grass pollen group-2/3 allergen* com similaridade estrutural ao domínio carboxi-terminal de β -expansinas) produzidas por *E. coli* (COSGROVE & TAKEDA, 2007); algumas expansinas de arroz (*O. sativa*) produzidas por *E. coli* (SEKI et al., 2015); a α -expansina Cs-EXPA1 de pepino (*C. sativus*), a α -expansina LeEXPA3 de tomateiro (*L. esculentum*) e a α -expansina Nt-EXPA4 de tabaco (*Nicotiana tabacum*) produzidas por *E. coli* (BERENDES et al., 2001); a α -expansina CsExp1 de pepino (*C. sativus*) produzida por plantas transgênicas de tomate (WHITNEY et al., 2000); a α -expansina Cs-EXPA1 de *C. sativus* produzida por plantas transgênicas de milho (YOON et al., 2016); e a α -expansina LeEXP2 de tomateiro (*L. esculentum*) produzida por *P. pastoris* (MA et al., 2011; LIU et al., 2014).

O sucesso da produção de proteínas recombinantes por *P. pastoris* depende de muitos fatores, como a escolha do vetor de expressão, cepa de levedura, sinal de secreção, otimização de códons, a presença de um tag de afinidade, o processamento correto da região N-terminal, número de cópias integradas e condições de crescimento. Por causa desses fatores, cada proteína precisa de customização de suas próprias condições de expressão. Por exemplo, COSTA (2016) identificou um gene codificador de β -expansina (*expb11*) de cana-de-açúcar (cultivar RB867515). Este gene foi clonado no vetor pPIC9 (sequência codificadora nativa, sinal de secreção de *S. cerevisiae*; sem cauda de afinidade; cepas de *P. pastoris* GS115 e SMD1168). O autor confirmou por PCR a transformação e a integração no genoma de *P. pastoris*, no entanto, não observou transcrição do gene alvo nem secreção da proteína, quando o sobrenadante dos cultivos foi avaliado por SDS-PAGE.

LIU et al. (2014) clonaram a sequência codificadora da α -expansina *LeEXP2* de tomateiro no vetor pPICZ α A e confirmaram a produção da proteína (70.9 mg/L). Estratégia semelhante foi relatada por WANG et al. (2014) para a produção da *swollenin* de *T. reesei* (*TrSwo1*) e da *expansina-like* de *B. subtilis* (*BsEXLX1*) (120 mg/L e 860 mg/L, respectivamente). A mesma abordagem foi empregada por TOVAR-HERRERA et al. (2015) para a produção da *expansina-like* *ScExlx1* do fungo *S. commune* e por QUARANTIN et al. (2019) para a produção das *cerato-platanins* *FgCPP1* e *FgCPP2* de *F. graminearum*, no entanto, dados de rendimento não foram disponibilizados. Diferentemente desses casos, no presente trabalho as β -expansinas de cana-de-açúcar *SacEXP82* e *SacEXP49* foram produzidas por *P. pastoris* X-33 sem a presença de uma cauda de afinidade e mantendo a sequência nativa do peptídeo sinal. Os resultados mostraram a secreção das β -expansinas no meio, indicando que o sinal nativo de monocotiledônea foi reconhecido e clivado corretamente por *P. pastoris* X-33, o que abre a oportunidade de utilizar essa estratégia de clonagem para produção recombinante de outras proteínas de *Saccharum*.

Como visto, as β -expansinas recombinantes de cana-de-açúcar *SacEXP82* e *SacEXP49* apresentaram tamanhos diferentes dos preditos (Figura 26), indicando a ocorrência de modificação pós-traducional. LIU et al. (2014) relataram que a α -expansina de tomateiro *LeEXP2* apresentou múltiplas bandas que variaram de 27 a 45 kDa na análise de SDS-PAGE. Para a *swollenin* de *T. reesei* (*TrSwo1*) e para a *expansina-like* de *B. subtilis* (*BsEXLX1*), glicosilação foi observada (WANG et al., 2014), o mesmo ocorrendo para a *expansina-like* *ScExlx1* de *S. commune* (TOVAR-HERRERA et al., 2015) e para as *cerato-platanins* *FgCPP1* e *FgCPP2* de *F. graminearum* (QUARANTIN et al., 2019). Em geral, a presença da

cauda de histidina ou de modificações pós-traducionais parece não ter um efeito negativo sobre a função de expansinas, expansinas-like, *swollenin* e *cerato-platanin* produzidas por *P. pastoris* (LIU et al., 2014; WANG et al., 2014; TOVAR-HERRERA et al., 2015; QUARANTIN et al., 2019). Isso também foi observado para diferentes *swollenins* (*TpSwo*, *TpSwo2*, *PoSwo1*, *AfSwo1*, *TrSwo1*, *ThSwo*) que foram expressas em fungos filamentosos (SALOHEIMO et al., 2002; YAO et al., 2008; CHEN et al., 2010; WANG et al., 2010; ZHOU et al., 2011; GOURLAY et al., 2012; KANG et al., 2013; GOURLAY et al., 2015; ROCHA et al., 2016).

4.3.2. As β -expansinas recombinantes SacEXP82 e SacEXP49 não possuem atividade hidrolítica sobre papel filtro e são capazes de se ligar à celulose microcristalina

Por definição as expansinas são consideradas proteínas não hidrolíticas, dessa forma, espera-se que em reações de hidrólise de substratos celulósicos com essas proteínas não ocorra a liberação de açúcares redutores. Os extratos proteicos concentrados e dialisados contendo as expansinas recombinantes SacEXP49 e SacEXP82 foram aplicados em reações de hidrólise de papel filtro Whatman No. 1 a 30°C e 50°C, em pH 4,8 e pH 5,0. Não foram detectados açúcares redutores nessas reações, indicando que as β -expansinas recombinantes SacEXP49 e SacEXP82 não foram capazes de hidrolisar a celulose do papel filtro.

Devido à sua reconhecida atividade não catalítica, a avaliação funcional de expansinas e expansinas-like é baseada em diferentes ensaios não enzimáticos (COSGROVE, 2017) e a ligação à polissacarídeos ou paredes celulares das plantas é um dos testes mais usados (YENNAWAR et al., 2006; LIU et al., 2014; KERFF et al., 2008; EIBINGER et al., 2016). No presente trabalho, investigou-se a capacidade de ligação à celulose microcristalina (Avicel PH-101) das β -expansinas de cana-de-açúcar recombinantes por análise de SDS-PAGE.

Inicialmente foi realizado um ensaio de ligação à celulose com o sobrenadante do cultivo em frascos cônicos do transformante pPICZB_SacEXP82 P4 (40 μ g de proteína) e o sobrenadante do cultivo da cepa controle (contendo vetor pPICZB vazio). O resultado deste ensaio é mostrado na Figura 27, na qual observa-se que uma banda de aproximadamente 35-37 kDa foi ligada à celulose microcristalina. Esses dados de ligação à celulose microcristalina reforçam os resultados anteriormente obtidos de identificação desta mesma banda por espectrometria de massas e sua identidade com a β -expansina SacEXP82 de cana-de-açúcar.

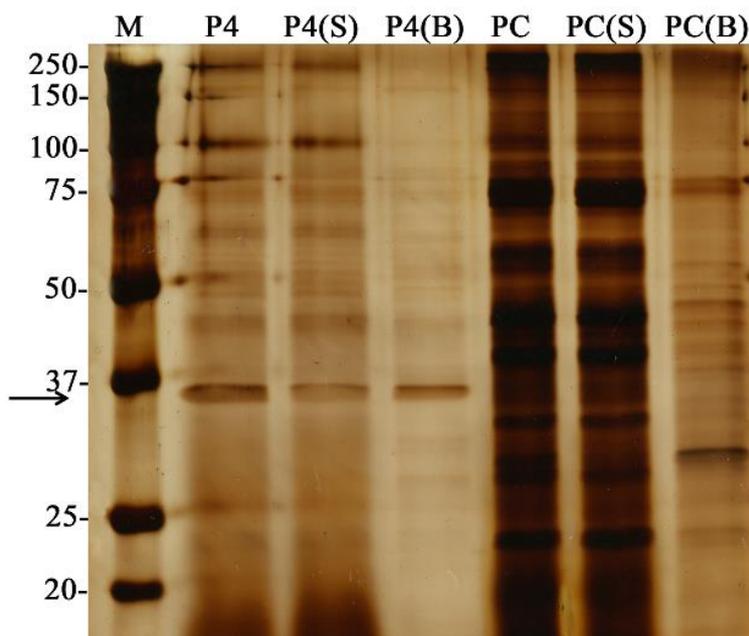


Figura 27. Análise de SDS-PAGE do sobrenadante do cultivo do transformante pPICZB_SacEXP82 P4 em ligação com substrato celulósico (Avicel PH-101) a 25°C a 900 rpm overnight. Da esquerda para direita M: marcador (kDa) Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard – BIO-RAD (Criterion 10- 20% Tris-Tricine). P4: sobrenadante do cultivo do transformante P4 sem Avicel (controle), P4 (S): P4 após tratamento com Avicel contendo proteínas que não se ligaram ao substrato, P4(B): banda putativa (SacEXP82) eluída de Avicel. PC: Sobrenadante do cultivo do transformante controle com vetor pPICZB vazio sem Avicel, PC(S): PC após tratamento com Avicel e PC(B) proteínas eluídas de Avicel. Nos poços P4, P4 (S), PC, PC(S) foram aplicados 40 µg de proteína total e nos poços P4 (B) e PC (B) todo o material eluído a partir de Avicel foi concentrado por speedvac e aplicado no gel. A concentração de proteína total foi estimada pelo método do ácido bicinonínico (BCA). As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida com malha de 12%.

Um novo ensaio de ligação à celulose foi realizado com as duas proteínas estudadas, utilizando o sobrenadante dos cultivos em maior escala feitos em biorreator (cepa pPICZB_SacEXP82 P4) e em frascos cônicos (cepa pPICZB_SacEXP49 P1). Os resultados obtidos utilizando 30 µg de proteína total do extrato proteico concentrado e dialisado mostraram que as duas proteínas foram capazes de se ligar à celulose microcristalina nas condições utilizadas (tampão citrato 50 mM, pH 4,8, 30°C e 50°C, por 24 horas) (Figura 27). Isso é evidenciado pela visualização de bandas correspondentes às proteínas ligadas à Avicel que foram eluídas desse substrato após 10 lavagens (Figura 28) e que correspondem às proteínas com aproximadamente 35-37 kDa a 95 kDa para SacEXP82 e uma banda proeminente de aproximadamente 55 kDa para SacEXP49. A diferença na intensidade das bandas da Figura 28 indica que as β-expansinas possivelmente apresentaram maior afinidade de ligação à Avicel a 30°C do que a 50°C nas condições utilizadas.

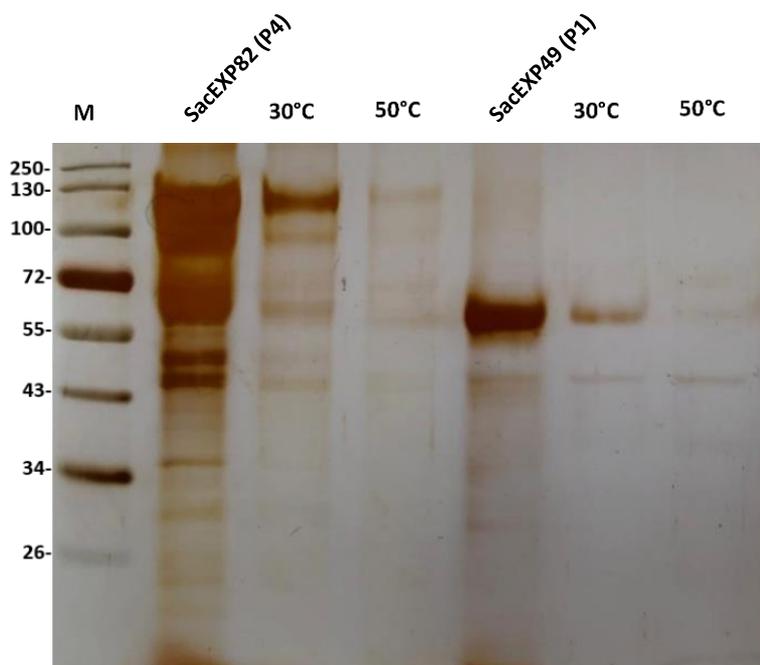


Figura 28. Análise por SDS-PAGE da adsorção das β -expansinas de cana-de-açúcar recombinantes SacEXP82 e SacEXP49 em celulose microcristalina Avicel PH-101. M: marcador molecular (Thermo Scientific PageRuler prestained protein ladder). Foram adicionados 30 μ g de proteína do extrato proteico concentrado e dialisado do transformante pPICZB_SacEXP82(P4). As canaletas 3 e 4 indicam a SacEXP82 adsorvida a Avicel a 30°C e 50°C, respectivamente, após 24 h. Foram adicionados 30 μ g de proteína do extrato proteico concentrado e dialisado do transformante pPICZB_SacEXP49 (P1). As canaletas 6 e 7 indicam a SacEXP49 adsorvida a Avicel a 30°C e 50°C, respectivamente, após 24 h.

As propriedades de ligação ao substrato são importantes para a funcionalidade de expansinas e de expansinas-*like* (LIU et al., 2015; COSGROVE, 2017). A afinidade pelo substrato pode ser influenciada por muitos fatores, além disso, os testes são frequentemente realizados sob condições reacionais distintas, tornando difícil a comparação de diferentes expansinas e expansinas-*like* (LIU et al., 2015; EIBINGER et al., 2016). Assim como observado no presente trabalho para as β -expansinas recombinantes SacEXP82 e SacEXP49, a ligação à celulose microcristalina também foi relatada para a *swollenin* (*TrSwo1*) do fungo *T. reesei* (EIBINGER et al., 2016). Entretanto, quando comparada à ligação a outros substratos, *TrSwo1* apresentou a maior afinidade e especificidade para xilana seguida de lignina e celulose microcristalina, nas condições utilizadas (tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, 25°C, por 2 h). Interessantemente, uma outra *swollenin* do fungo *A. fumigatus* (*AfSwo1*) apresentou afinidade de ligação significativa à celulose microcristalina e também à quitina (em tampão fosfato 15 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM, por 30 min), mas sem afinidade de ligação óbvia com xilana (CHEN et al., 2010). Com relação às expansinas-*like*

bacterianas, a capacidade de ligação à celulose microcristalina, bem como a outros substratos celulósicos, hemicelulósicos e lignina também é recorrentemente relatada (KERFFet al., 2008; LIN et al., 2013; KIM et al., 2013; GEORGELIS et al., 2015; LIU et al., 2015; WANG et al., 2016; MARTINEZ-ANAYA, 2016).

Para algumas expansinas de plantas a ligação à celulose microcristalina também já foi demonstrada. Por exemplo, SEKI et al. (2015) mostraram por meio de análise de SDS-PAGE que a α -expansina de arroz *OsEXPA4* produzida por *E. coli* foi capaz de se ligar à Avicel PH-101 em reações realizadas com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) a 50°C por 18 h. A α -expansina *LeEXP2* de tomateiro produzida por *P. pastoris* também foi capaz de se ligar à Avicel, entretanto, nas condições usadas (tampão citrato 0,05 M, pH 4,8, a 25°C por 1 h) esta proteína se ligou preferencialmente aos outros substratos testados (xilana e biomassa de milho pré-tratada) (LIU et al., 2014).

Com relação às β -expansinas de plantas, YENNAWAR et al. (2006) mostraram que a expansina *ZmEXPB1* nativa purificada do pólen de milho apresentou maior afinidade de ligação aos substratos hemicelulósicos (xiloglucana, xilana de aveia, xilana de bétula) do que aos substratos celulósicos testados (glucana, glucomanana) na forma imobilizada sobre membranas de nitrocelulose, em reações realizadas com acetato de sódio 20 mM (pH 5,5) a 25°C por 1 h. TABUCHI et al. (2011) mostraram que *ZmEXPB1* solubiliza arabinóxilana e homogalacturonanas de paredes de gramíneas, o que torna esse tipo de β -expansina marcadamente diferente das α -expansinas e das expansinas-like de bactérias. Interessantemente, WANG et al. (2016) forneceram evidências diretas de que *ZmEXPB1* liga-se primariamente a glucuronoarabinóxilana (GAX), principal polissacarídeo da matriz nas paredes celulares (em reações em acetato de sódio 20 mM, pH 5,5, a 26°C por 1 h). De fato, dados de RMN mostraram que a expansina *ZmEXPB1* não se liga à celulose em misturas de paredes celulares de milho, apesar de se ligar fracamente à celulose microcristalina (Avicel PH-101) *in vitro* nas condições utilizadas. A atividade de outras β -expansinas de milho provavelmente difere das proteínas do pólen de milho, como *ZmEXPB1*, mas isso ainda não foi avaliado experimentalmente (COSGROVE, 2015; WANG et al., 2016).

Do exposto, é possível concluir que diferentes expansinas de plantas (das subfamílias EXPA e EXPB) nativas ou recombinantes caracterizadas até o momento são capazes de se ligar à celulose microcristalina, no entanto, para as poucas β -expansinas de plantas caracterizadas funcionalmente em nível detalhado (p. ex.: *ZmEXPB1*) a afinidade por outros polissacarídeos, tais como os que compõem a hemicelulose, é maior, conforme revelado pelos estudos citados. No presente trabalho, não foi avaliada a ligação das β -expansinas

recombinantes de cana-de-açúcar à outros tipos de polissacarídeos ou paredes celulares, e novos testes deverão ser realizados futuramente para uma melhor compreensão do espectro de afinidade do substrato das β -expansinas SacEXP82 e SacEXP49. Em todo caso, os dados obtidos comprovam que essas β -expansinas recombinantes de cana-de-açúcar foram capazes de se ligar à um substrato celulósico e em função disso outros experimentos foram realizados para melhor compreensão de características básicas dessas proteínas.

4.3.3. Efeito das β -expansinas recombinantes da cana-de-açúcar na sacarificação enzimática de substratos celulósicos

Desde os primeiros relatos de que as expansinas das plantas podem aumentar a atividade de celulasas ou a taxa de hidrólise na sacarificação enzimática da celulose (COSGROVE et al., 1998; BAKER et al., 2000; COSGROVE, 2001), ensaios para investigar a sinergia com celulasas ou hemicelulasas na liberação de açúcares solúveis de diferentes substratos têm sido amplamente utilizados como uma forma indireta de avaliar a atividade funcional de expansinas e de expansinas-*like*.

A ação das expansinas resulta na redução da cristalinidade da celulose. Isso pode favorecer a digestibilidade da biomassa lignocelulósica pela ação de celulasas. Dessa forma, foi avaliado o efeito da aplicação das β -expansinas recombinantes de cana-de-açúcar SacEXP82 e SacEXP49 na sacarificação de bagaço de cana pré-tratado por método organosolv utilizando uma celulase comercial do fungo *T. reesei* (Celluclast). O extrato protéico concentrado e dialisado oriundo do cultivo da cepa controle de *P. pastoris* X-33 (com vetor vazio pPICZB) em frascos de Erlenmeyer também foi incluído na análise. A proteína BSA foi incluída como controle para corrigir efeitos inespecíficos sobre a atividade da celulase. Os resultados são mostrados na Figura 29.

Os resultados mostraram que a adição dos extratos proteicos enriquecidos com as β -expansinas recombinantes SacEXP82 e SacEXP49 não resultou em maior quantidade de açúcares redutores ao final da hidrólise do bagaço pré-tratado por processo organosolv (Figura 29), em comparação com o controle nas condições utilizadas (baixa carga enzimática: 0,48 FPU/g de substrato). Isto foi observado tanto no ensaio de pré-incubação (“pré-tratamento”) como no ensaio simultâneo (“sinergismo”).

A extensão da melhoria na hidrólise da biomassa lignocelulósica com adição de proteínas auxiliares como as expansinas (DU et al., 2018) ou outras proteínas, p. ex., mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) (SUN et al., 2015; HU et al., 2015) é altamente dependente do tipo de substrato e pré-tratamento, do teor de sólidos, bem como da fonte e da

quantidade de celulase utilizada. Assim como observado no presente trabalho para as β -expansinas recombinantes SacEXP82 e SacEXP49, alguns estudos relataram uma ausência de interação sinérgica entre celulases e expansinas/expansinas-like, ou que o sinergismo não foi significativamente maior do que o observado quando uma proteína de sacrifício como BSA é usada na hidrólise. Essas observações foram explicadas em parte pela competição pelos locais de ligação do substrato sob certas condições de reação (KIM et al., 2009; WANG et al., 2014; LIN et al., 2013; EIBINGER et al., 2016; LIU et al., 2015).

Outros mecanismos foram propostos para explicar casos semelhantes ao observado no presente trabalho para SacEXP82 e SacEXP49. Por exemplo, Georgelis et al. (2015) propuseram alguns mecanismos que podem ser responsáveis por um aumento não específico da atividade da celulase, p. ex., aumento da estabilidade da celulase, diminuição da ligação improdutiva ao substrato ou que a expansina / expansina-like pode agir como surfactante devido à sua estrutura proteica ser composta por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Portanto, outras condições devem ser avaliadas, a fim de investigar o potencial sinérgico das expansinas recombinantes obtidas no presente trabalho no processo de sacarificação. No caso, outros testes foram realizados para indicar o melhor uso das expansinas recombinantes da cana-de-açúcar, por exemplo, foi avaliada a capacidade dessas proteínas de causar mudanças nas propriedades físicas das fibras de celulose, conforme relatado a seguir.

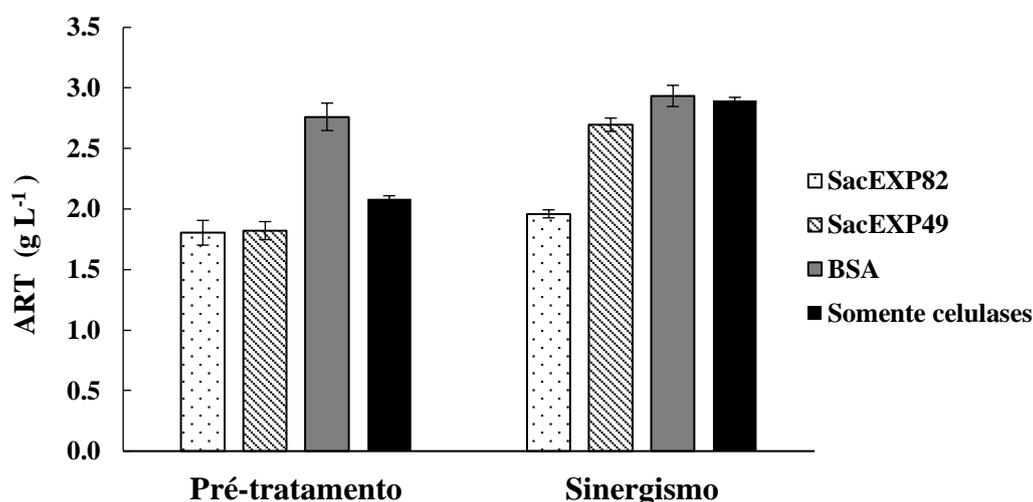


Figura 29. Efeito da adição de β -expansinas recombinantes na sacarificação de cana tratado pelo processo Organosolv. Os experimentos foram realizados com 5 mg.mL⁻¹ de biomassa incubada a 900 rpm e 30°C. No ensaio de pré-tratamento, a biomassa foi incubada com extratos proteicos concentrados ou BSA (10 mg/g) por 24 h. Após incubação, Celluclast (1,2 FPU/g) foi adicionada e a reação mantida na mesma temperatura por 24 h. Em ensaios de sinergismo, extratos proteicos concentrados ou BSA foram adicionados em combinação com Celluclast e incubados por 24 h. Os ensaios foram realizados em triplicata, barras de erro indicam as médias \pm desvio padrão.

4.3.4. Determinação da força tênsil e deformação de papel filtro tratado com as expansinas recombinantes de cana-de-açúcar SacEXP82 e SacEXP49

A avaliação da resistência à tração de papel filtro incubado com o extrato proteico contendo as expansinas recombinantes SacEXP49 e SacEXP82 foi realizada para verificar se estas expansinas possuem um efeito de "afrouxamento" do substrato celulósico devido à ruptura de pontes de hidrogênio. As reações foram realizadas em dois pHs (4,8 e 5,5) e duas temperaturas (30°C e 50°C), sendo que a melhor condição para funcionalidade de ambas as proteínas foi pH 4,8 e 30°C. Não foram observadas diferenças entre a tensão máxima suportada pelo papel filtro incubado em tampão acetato de sódio com e sem adição de BSA (dados não mostrados), portanto este teste definiu como controle negativo a reação contendo 1,2 mg/mL de BSA em tampão acetato de sódio.

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 30. Observou-se uma redução de 53% na tensão máxima das amostras incubadas com o controle positivo (Ureia 8M) em relação ao controle negativo (1,2 mg/mL BSA), resultado esperado devido à característica disruptiva das ligações de hidrogênio da uréia.

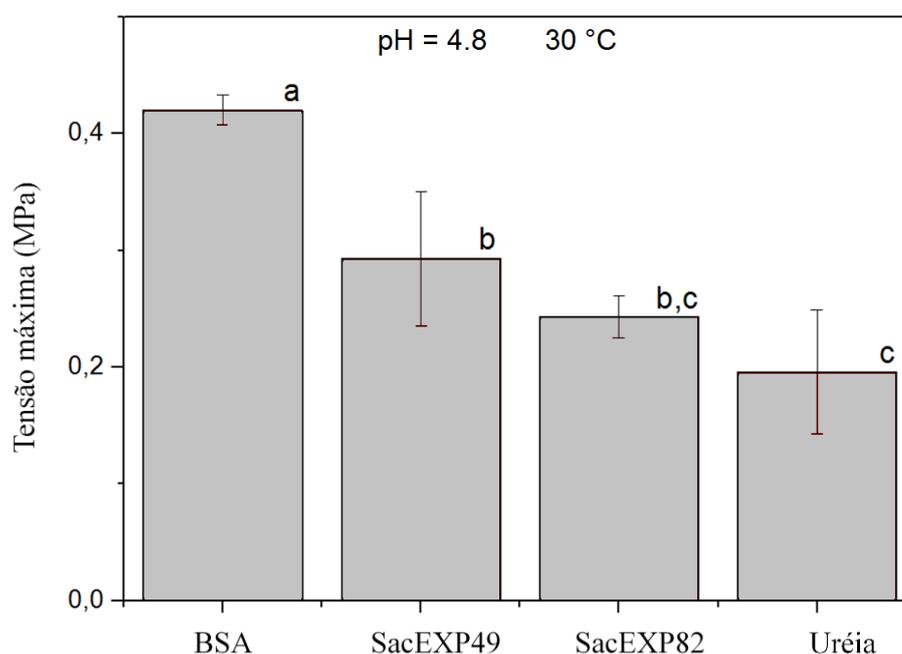


Figura 30. Comparação da resistência à tração (tensão máxima em MPa) do substrato celulósico (papel filtro Whatman nº 3) tratado com BSA (controle negativo), SacEXP49, SacEXP82 e Uréia (controle positivo) em pH 4,8, 30°C por 1 hora. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (com nível de confiança de 95%). Pelo menos cinco tiras de papel foram usadas para cada condição. As barras de erro representam o desvio padrão da medição.

Essa redução está de acordo com os valores obtidos por Kim et al. (2009), que observaram uma redução de 50% na tensão máxima suportada pelas amostras incubadas em ureia em relação ao controle negativo, e é levemente superior aos valores obtidos por Artzi et al. (2016), cuja redução na tensão máxima entre controle negativo e positivo foi de 43%.

Os valores máximos de tensão obtidos para as β -expansinas SacEXP49 e SacEXP82 indicam que ambas têm a capacidade de romper as ligações de hidrogênio do substrato celulósico em pH 4,8 a 30°C, sendo este efeito mais pronunciado para a β -expansina SacEXP82 (Figura 30).

A aplicação da β -expansina SacEXP49 levou a uma redução de 31% na tensão máxima quando comparada ao controle negativo. Este efeito é comparável ao observado por Kim et al. (2009) para a expansina-like EXLX1 da bactéria *B. subtilis* em condições idênticas, (Tabela 14). Por outro lado, a aplicação da β -expansina SacEXP82 resultou em amostras de papel filtro com uma redução de 42% nos valores de tensão máxima, em comparação com o controle negativo. Os valores da Tabela 14 mostram que o efeito da β -expansina SacEXP82 é pronunciado e similar ao resultado obtido por Artzi et al. (2016), que relataram uma redução dos valores das tensões máximas do papel filtro incubado com a expansina-like *Cc*/EXL1 da bactéria *Clostridium clariflavum* de 44,4% em relação ao controle negativo.

Tabela 14. Valores comparativos de resistência à tração de papel filtro encontrados para algumas expansinas e sua comparação com os resultados obtidos no presente trabalho[#].

Expansina/expansina-like	pH	Temperatura (°C)	Tempo de incubação	Redução da força tênsil	Referência
<i>Saccharum officinarum</i> (SacEXP49)	4.8	30	1	31*	Este trabalho
<i>Saccharum officinarum</i> (SacEXP82)	4.8	30	1	42	Este trabalho
<i>Hahella chejuensis</i> (HcEXLX2)	4.8	25	1	53**	Lee et al. (2010)
<i>Bacillus subtilis</i> (BsEXLX1)	7.5***	25	4	20	Georgelis et al. (2011)
<i>Bacillus subtilis</i> (BsEXLX1)	4.8	30	1	29	Kim et al. (2009)
<i>Trichoderma reesei</i> (swollenin SWO1)	5.0	t.a.	15 min	15-20	Saloheimo et al. (2002)
<i>Clostridium clariflavum</i> (CcEXL1)	5.5	55	1	44.4	Artzi et al. (2016)

* Em relação ao controle negativo.** 53% do efeito observado para o controle positivo.*** Usado tampão HEPES em vez de tampão de acetato.[#]Para comparação com resultados publicados, é necessário usar o valor da tensão, que foi calculado considerando a área da seção transversal das tiras de papel de filtro (tensão = força / área da seção transversal).

O teste de Tukey ($\alpha = 0.05$) indicou que não há diferença estatística entre os valores de tensão máxima das amostras de papel filtro incubadas com β -expansina SacEXP82 e uréia 8M (controle positivo), indicando que esta expansina recombinante de origem vegetal (cana-de-açúcar) tem um efeito pronunciado de afrouxamento das fibras do substrato celulósico, estatisticamente semelhante ao observado para o controle positivo.

A deformação do papel filtro nos diferentes tratamentos também foi analisada, mas não houve diferença estatística entre os valores obtidos. A deformação situou-se entre 3,96% (para a β -expansina SacEXP82) e 5,78% (para a β -expansina SacEXP49).

Em conjunto, os resultados obtidos mostram que as β -expansinas de cana-de-açúcar recombinantes SacEXP82 e SacEXP49 produzidas por *P. pastoris* são ativas e podem ser aplicadas diretamente, na sua forma isolada (conforme testado), ou na forma de uma mistura ou composição entre elas (sem a necessidade de purificação, ou seja, na forma de um extrato proteico concentrado) para diminuir a resistência à tração de fibras de celulose, como as que compõem o papel filtro ou outros tipos de materiais à base de fibras de celulose. Isso abre a possibilidade de avaliação dessas proteínas como bioprodutos renováveis para aplicações na indústria de celulose que dependem de mudanças nas propriedades físicas da fibra para obter produtos derivados com características distintas.

4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Duas expansinas de cana-de-açúcar (SacEXP49 e SacEXP82) previamente identificadas como específicas dos tecidos do colmo de plantas adultas foram produzidas com sucesso por *P. pastoris* X-33. A funcionalidade das proteínas recombinantes foi evidenciada pela sua capacidade de diminuir significativamente a força tênsil de fibras de papel filtro. Essa capacidade mostrou-se dependente do pH e da temperatura da reação, sendo que as melhores condições e resultados foram observados para a expansina SacEXP82 em pH 4,8 e 30°C. Nesse aspecto, estas proteínas podem ser consideradas como um bioproduto de origem renovável para modificação das propriedades físicas da celulose.

No presente trabalho foi realizada uma caracterização preliminar das proteínas SacEXP49 e SacEXP82 recombinantes, sendo possível concluir que essas expansinas não possuem atividade hidrolítica sobre papel filtro e são capazes de se ligar à celulose microcristalina. Embora uma caracterização bioquímica mais detalhada seja necessária para definir a especificidade de substrato dessas expansinas, os dados obtidos permitem inferir que a ligação à celulose microcristalina foi mais efetiva a 30°C do que a 50°C.

A otimização do cultivo das cepas geneticamente modificadas de *P. pastoris* X-33 produtoras das β -expansinas SacEXP49 e SacEXP82 pode ser realizada em estudos futuros. Os resultados obtidos sobre clonagem e expressão devem incentivar trabalhos sobre caracterização dos mais de 90 genes codificadores de expansina no genoma da cana-de-açúcar e definir as melhores condições para o uso dessas proteínas na agricultura, agroindústria, indústrias à base de celulose e na biologia de espécies do complexo *Saccharum*. Tais estudos estão em andamento em nosso laboratório (FÁVARO et al., 2019) e foram facilitados pela estratégia de clonagem e expressão desenvolvida neste trabalho.

4.5. REFERÊNCIAS

ADESOGAN, A.; ARRIOLA, K.; JIANG, Y.; OYEBADE, A.; PAULA, E.; PECH-CERVANTES, A.; ROMERO, J.; FERRARETTO, L.; VYAS, D. Symposium review: Technologies for improving fiber utilization. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 6, p. 5726-5755, 2019. ISSN 0022-0302.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels*, v. 3, p. 4, Feb 23 2010. ISSN 1754-6834.

ARTZI, L., MORAG, E., SHAMSHOUM, M., BAYER, E.A. Cellulosomal expansin: functionality and incorporation into the complex. *Biotechnol. Biofuels*. v.9, p.61-76, 2016.

BAKER, J. O.; KING, M. R.; ADNEY, W. S.; DECKER, S. R.; VINZANT, T. B.; LANTZ, S. E.; NIEVES, R. E.; THOMAS, S. R.; LI, L. C.; COSGROVE, D. J.; HIMMEL, M. E. Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p. 217-223, 2000.

BERENDES, F.; RAST, H-G.; VOGT, U.; GOULLOUDIS, C. Method for producing recombinant expansins. **WO2001088163A1**. Concessão: 22/11/2001. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a5/11/4e/06cf741563879e/WO2001088163A1.pdf>. Acesso em: 28/11/2019.

BROTMAN, Y; BRIFF, E; VITERBO, A; CHET, I. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology*, v.147, p.779-789, 2008.

CASU, R. E.; JARMEY, J. M.; BONNETT, G. D.; MANNERS, J. M. Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. *Functional & integrative genomics*, v. 7, n. 2, p. 153-167, 2007. ISSN 1438-793X.

CGEE, CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. Projeto: Mapeamento de Competências em Temas Estratégicos em Bioeconomia. In: PANORAMA Preliminar das Áreas da Bioeconomia no Brasil e suas Conexões com os Objetivos do Desenvolvimento

Sustentável – ODS. Brasília, p. 6-22, 2016.. Disponível em: https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/2441_Nota+T%C3%A9cnica+-+Bioeconomia+-+ODS+-+Ver+Final.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2019.

CGEE, C. D. G. E. E. E. **Química Verde no Brasil 2010- 2030**. Brasília: 2010. ISBN 978-85-60755-31-8.

CHASE, W. R.; ZHAXYBAYEVA, O.; ROCHA, J.; COSGROVE, D. J.; SHAPIRO, L. R. From morphogenesis to pathogenesis: A cellulose loosening protein is one of the most widely distributed tools in nature. **bioRxiv**, p. 637728, 2019. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/05/16/637728.full.pdf>> Acesso em: 29 nov. 2019.

CHEN, X.-A.; ISHIDA, N.; TODAKA, N.; NAKAMURA, R.; MARUYAMA, J.-I.; TAKAHASHI, H.; KITAMOTO, K. Promotion of efficient saccharification with *Aspergillus fumigatus* AfSwo1 towards crystalline cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, 2010. ISSN 0099-2240.

CN103866604A Paper making method for increasing bulkiness and softness of lifepaper. **CN103866604A**. Depósito: 13/13/2019. Concessão: 18/06/2014. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN103866604A/en?q=expansin&q=plant&q=cellulose&q=tensile&num=100&oq=expansin+plant+cellulose+tensile&dups=language&clustered=true>>. Acesso em: 28/11/2019.

CNI, CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. Bioeconomia : oportunidades, obstáculos e agenda. In: PROPOSTAS da indústria eleições. Brasília: **Mapa Estratégico da Indústria**, v.35, 2014. Disponível em:<http://arquivos.portaldaindustria.com.br/app/conteudo_24/2014/07/22/479/V35_Bioeconomiaoportunidadesobstaculoseagenda_web.pdf>. Acesso em: 28/11/2019.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. In: ACOMPANHAMENTO da safra brasileira de cana-de-açúcar.. Brasília: **Companhia Nacional de Abastecimento**, Brasília, v.992, n 4, p. 1-75. 2013. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info993agro/safra/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, – Safra 2018/2019, Quarto levantamento, Brasília, abril de 2019. – **Companhia Nacional de Abastecimento** – Brasília: Conab, v.5, n4, p. 1-75 2013. ISSN 2318-7921. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 06 de maio de 2019.

COSGROVE D. J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. **Current opinion in plant biology**, v.25, p.162–172, 2015

COSGROVE, D. J. Loosening of Plant Cell Walls by Expansins. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 321-326, 2000.

COSGROVE, D. J. Microbial expansins. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 479-497, 2017. ISSN 0066-4227.

COSGROVE, D. J.; DURACHKO, D. M.; LI, L.-C. Expansins may have cryptic endoglucanase activity and can synergize the breakdown of cellulose by fungal cellulases. **Annu. Meeting Am. Soc. Plant Physiol**, v. 171, 1998.

COSGROVE, D. J. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. **Plant physiology**, v. 125, n. 1, p. 131-134, 2001.

COSGROVE, D.J.; TAKEDA, T. The Penn State Research Foundation. Use of GR2 proteins to modify cellulosic materials and to enhance enzymatic and chemical modification of cellulose, United States **Patent 20070166805**, 2007.

COSTA, I. G. D. O. Clonagem e expressão de uma β -expansina de cana-de-açúcar na levedura *Pichia pastoris*. **Dissertação de mestrado**, Goiânia, 2016.

DE-SOUZA, M.T.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Técnicas básicas em biologia molecular. 2. ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2016.

DU, J.; SONG, W.; ZHANG, X.; ZHAO, J.; LIU, G.; QU, Y. Differential reinforcement of enzymatic hydrolysis by adding chemicals and accessory proteins to high solid loading substrates with different pretreatments. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 8, p. 1153-1163, 2018. ISSN 1615-7591.

DUTT, A. P. K. ; DUTTA, J. ; TRIPATHI, V.S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.63, p.20-31, 2004..

EIBINGER, M.; SIGL, K.; SATTELKOW, J.; GANNER, T.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B.; PLANK, H.; NIDETZKY, B. Functional characterization of the native swollenin from *Trichoderma reesei*: study of its possible role as C 1 factor of enzymatic lignocellulose conversion. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 178, 2016. ISSN 1754-6834.

FÁVARO, L. C. L.; RODRIGUES, D. S.; DAMASO, M. C. T.; SALUM, T. F. C.; GONCALVES, S. B. ; MENDES, T. D. ; ANDREANI, L.; VALADARES. L. F.; SILVA, F. M.; PEIXOTO, J. S. G. Polinucleotídeos codificando expansinas de cana-de-açúcar, microrganismo geneticamente modificado, processo para produzir uma expansina, preparação proteica, uso da preparação proteica, e processo para produzir um microrganismo geneticamente modificado. Patente: Privilégio de Inovação. **BR1020190214805**. Depósito: 11/10/2019.

FAVARO, L. D. L.; POLETTO, C. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. Brasília, DF: **Embrapa Agroenergia**, 1ª Ed. Curitiba: Editora Íthala; p. 35-79, 2013.

GEORGELIS, N., YENNAWAR, N.H., COSGROVE, D.J. Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 37, p. 14830-14835, 2012.

GEORGELIS, N., TABUCHI, A., NIKOLAIDIS, N., COSGROVE, D.J. Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 19, p. 16814-16823, 2011.

GEORGELIS, N.; NIKOLAIDIS, N.; COSGROVE, D. J. Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 9, p. 3807-3823, 2015. ISSN 0175-7598.

GONÇALVES, A. L. **Prospecção e caracterização da família gênica Expansina, envolvida na modificação estrutural da celulose cristalina em cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado. Escola de Lorena, Universidade de São Paul, 2017.

GOURLAY, K.; HU J, ARANTES V, ANDBERG M, SALOHEIMO M, (2013) Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresource Technology* 142:498–503.

GOURLAY, K., HU, J., ARANTES, V., ANDBERG, M., SALOHEIMO, M., PENTTILÄ, M., & SADDLER, J. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource technology**, v. 142, p. 498-503, 2013

GOURLAY, K., ARANTES, V., & SADDLER, J. N. Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 51, 2012.

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T. ., SOUTO-MAIOR, A. M. , ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HU, J.; CHANDRA, R.; ARANTES, V.; GOURLAY, K.; VAN DYK, J. S.; SADDLER, J. N. The addition of accessory enzymes enhances the hydrolytic performance of cellulase enzymes at high solid loadings. **Bioresour. Technol**, v.186, p. 149–153, 2015.

JPH08510728A. Expansin such weakening protein and paper fibers bound catalyzes the elongation of plant cell walls. **JPH08510728A**. Concessão: 12/11/1996. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/JPH08510728A/en?q=expansin&q=plant&q=cellulose&q=tensile&num=100&oq=expansin+plant+cellulose+tensile&dups=language&clustered=true>> Acesso em: 29 nov. 2019

KANG K, WANG SW, LAI GH, LIU G, XING M .Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. **BMC Biotechnol**.v.13, p.42, 2013.

KENDE, H.; BRADFORD, K.; BRUMMELL, D. A.; CHO, H.-T.; COSGROVE, D. J.; FLEMING, A. J.; GEHRING, C.; LEE, Y.; MCQUEEN-MASON, S.; ROSE, J. K. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. **Plant molecular biology**, v. 55, p. 311-314, 2004. ISSN 0167-4412.

KERFF, F., AMOROSO, A., HERMAN, R., SAUVAGE, E., PETRELLA, S., FILÉE, P., COSGROVE, D. J. Crystal structure and activity of Bacillus subtilis YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 44, p. 16876-16881, 2008.

KIM, I. J.; KO, H.-J.; KIM, T.-W.; NAM, K. H.; CHOI, I.-G.; KIM, K. H. Binding characteristics of a bacterial expansin (BsEXLX1) for various types of pretreated

lignocellulose. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5381-5388, 2013. ISSN 0175-7598

KIM, E. S.; LEE, H. J.; BANG, W. G.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, vol 102, nº 5, p. 1342 – 1353, 2009.

LEE, H. J., LEE, S., KO, H.J., KIM, K.H., CHOI, I.G., 2010. An expansin-like protein from *Hahella chejuensis* binds cellulose and enhances cellulose activity. *Mol. Cells* 29, 379-385.

LEE, Y.; KENDE, H. Expression of α -expansin and expansin-like genes in deepwater rice. **Plant Physiology**, v. 130, n. 3, p. 1396-1405, 2002. ISSN 0032-0889.

LIAN-CHAO, L.; COSGROVE, D. J. Plant cell wall loosening activity of group 2/3 allergens 1107 of grass pollen. United States Patent, **2004/0110190 A1**, 2004.

LI, L.; QU, M.; LIU, C.; XU, L.; PAN, K.; OUYANG, K.; SONG, X.; LI, Y.; LIANG, H.; CHEN, Z. Effects of recombinant swollenin on the enzymatic hydrolysis, rumen fermentation, and rumen microbiota during in vitro incubation of agricultural straws. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 348-358, 2019. ISSN 0141-8130.

LIMA, D.; SANTOS, H.; TINÉ, M.; MOLLE, F.; BUCKERIDGE, M. Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 191-198, 2001. ISSN 1415-4757.

LIN, H., SHEN, Q., ZHAN, J.M., WANG, Q., ZHAO, Y.H. Evaluation of bacterial expansin EXLX1 as a cellulase synergist for the saccharification of lignocellulosic agro-industrial wastes. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75022, 2013.

LIU, X.; LIU, C.; MA, Y.; HONG, J.; ZHANG, M. Heterologous expression and functional characterization of a novel cellulose-disruptive protein LeEXP2 from *Lycopersicon esculentum*. **Journal of biotechnology**, v. 186, p. 148-155, 2014. ISSN 0168-1656.

LIU, X.; MA, Y.; ZHANG, M. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 8, p. 1541-1551, 2015. ISSN 0141-5492.

MA Y. Y.; WANG X; WANG H. Z; ZHANG K; ZHANG MH (2011) The Expression *In Vitro* and Application on Cellulose Degradation of LeEXP2. **Advanced Materials Research**, v. 183-185, pp. 790-794, 2011. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.183-185.790>.

MA, J.; TAUSCHE, J. G. Pulp fiber modification using expansin or swollenin in combinations with one or more enzymes. **WO2013165568A1**. Depósito: 12/03/2013. Concessão: 07/11/2013. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/18/7b/5c/efa94e9d586347/WO2013165568A1.pdf>>. Acesso em: 28/11/2019.

MAROWA P, DING A, KONG Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. **Plant Cell Reports**, v.35, p.949-965, 2016.

MARTINEZ-ANAYA, C. Understanding the structure and function of bacterial expansins: a prerequisite towards practical applications for the bioenergy and agricultural industries. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 727-736, 2016. ISSN 1751-7915.

MAURER, M.; KÜHLEITNER, M.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. **Microbial cell factories**, v. 5, n. 1, p. 37, 2006. ISSN 1475-2859.

MATTIELLO, L.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; MARTINS, M. C. M.; DA CRUZ, L. P.; BASSI, D.; MARCHIORI, P. E. R.; RIBEIRO, R. V.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A.; MENOSSI, M. Physiological and transcriptional analyses of developmental stages along sugarcane leaf. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 300, 2015. ISSN 1471-2229.

MCQUEEN-MASON, S., DURACHKO, D. M. and COSGROVE, D. J. Two Endogenous Proteins That Induce Cell Wall Extension in Plants. **The Plant Cell**, v. 4, n. 11, p. 1425-1433, 1992.

MCQUEEN-MASON, S.; COSGROVE, Daniel J. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 14, p. 6574-6578, 1994.

NESTERENKO, M.V.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. A simple modification of Blum's silver stain 1376 method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. **J Biochem 1377 Biophys Methods**, v. 28, n. 3, p. 239-242, 1994.

PERE, J.; SALOHEIMO, M.; PENTTILÄ, M. Method of treatment of pulp useful for 1104 papermaking. **WO2006/136656 A1**. 2006.

PEREIRA, V. M. ; DIAS, B. B. A. ; SANTIAGO, T. R. ; Kobayashi, AK ; MOLINARI, H. B. C. ; FÁVARO, L. C. L. . Identification and expression of sugarcane culm-specific expansin genes. In: Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference - **BBEST**, 2017. Não paginado.

QUARANTIN, A., CASTIGLIONI, C., SCHÄFER, W., FAVARON, F., & SELLA, L. The *Fusarium graminearum* cerato-platanins loosen cellulose substrates enhancing fungal cellulase activity as expansin-like proteins. **Plant physiology and biochemistry**, v. 139, p. 229-238, 2019.

ROCHA, V. A. L., MAEDA, R. N., PEREIRA, N., JR, KERN, M. F., ELIAS, L., SIMISTER, R., STEELE-KING, C., GOMEZ, L.D., MCQUEEN-MASON, S. J. Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin, **Biotechnol. Prog.**, v.32, n. 2, p. 327-336, 2016.

SALOHEIMO, M; PALOHEIMO, M; HAKOLA, S; PERE, J; SWANSON, B; NYSSONEN, E; BHATIA, A; WARD, M; PENTTILA, M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with 24 sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 4202-4211, 2002.

SALOHEIMO, M.; PALOHEIMO, M.; HAKOLA, S.; PERE, J.; SWANSON, B.;

NYSSÖNEN, E.; ... & PENTTILÄ, M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **The FEBS Journal**, v. 269, n. 17, p. 4202-4211, 2002.

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

SAMPEDRO, J; COSGROVE, D.J.The expansin superfamily.**Genome Biology**, v.6, n.12, p.242, 2005.

SANTIAGO, T. R; PEREIRA, V. M; DE SOUZA, W. R; STEINDORFF, A. S; CUNHA, B. A. D. B; GASPAR, M; FÁVARO, L. C. L; FORMIGHIERI, E. F; KOBAYASHI, A. K; MOLINARI, H. B. C. Genome-wide identification, characterization and expression profile analysis of expansins gene family in sugarcane (*Saccharum spp.*). **PLoS One**, v. 13, p. e0191081, 2018.

SANTOS, C. A.; FERREIRA-FILHO J. A.; O'DONOVAN, A.; GUPTA, V. K.; TUOHY, M.G.; SOUZA, A.P. (2017) Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation. **Microb Cell Fact**, v.16, p.83, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0697-6>

SEKI, Y.; KIKUCHI, Y; YOSHIMOTO, R; ABURAI, K; KANAI, Y; RUIKE, T. Promotion of crystalline cellulose degradation by expansins from *Oryza sativa*.**Planta**, v. 241, p. 83–93, 2015.

SUN, F. F.; HONG, J.; HU, J.; SADDLER, J. N.; FANG, X.; ZHANG, Z.;& SHEN, S. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. **Enzyme and microbial technology**, v. 79, p. 42-48, 2015.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses.**Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

TABUCHI, A.; LI, L.C.; COSGROVE, D.J.Matrix solubilization and cell wall weakening by β -expansin (group-1 allergen) from maize pollen.**Plant J.**, v. 68, n.3, p.546-559, 2011.

TOVAR-HERRERA, O. E.; BATISTA-GARCÍA, R. A.; DEL RAYO SÁNCHEZ-CARBENTE, M.; IRACHETA-CÁRDENAS, M. M.; ARÉVALO-NIÑO, K.; FOLCH-MALLOL, J. L.A novel expansin protein from the white-rot fungus *Schizophyllum commune*.**PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0122296, 2015. ISSN 1932-6203.

VERMA, D.; KANAGARA, J. A.; JIN, S, SINGH ND, KOLATTUKUDY PE, DANIELL H (2010) Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyze lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. *Plant Biotechnology Journal* 8: 332-350.

VERMA, D., KANAGARAJ, A., JIN, S., SINGH, N. D., KOLATTUKUDY, P. E., & DANIELL, H. Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 3, p. 332-350, 2010.

WANG, M.; CAI, J.; HUANG, L.; L.V. Z.; ZHANG, Y.; XU, Z. High-level expression and

efficient purification of bioactive swollenin in *Aspergillus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2027-2036, 2010.

WANG, T.; CHEN, Y.; TABUCHI, A.; COSGROVE, D.J.; HONG, M. The target of β -expansin EXPB1 in maize cell walls from binding and solid-state NMR studies. **Plant Physiol**, v. 172, p. 2107-2119, 2016.

WANG, W.; LIU, C.; MA, Y.; LIU, X.; ZHANG, K.; ZHANG, M. Improved production of two expansin-like proteins in *Pichia pastoris* and investigation of their functional properties. **Biochemical engineering journal**, v. 84, p. 16-27, 2014. ISSN 1369-703X.

WEI W, YANG C, LUO J. Synergism between cucumber α -expansin, fungal endoglucanase and pectin lyase. **J Plant Physiol**, v.167, p. 1204–1210, 2010.

WHITNEY, S. E. C., GIDLEY, M. J. & MCQUEEN-MASON, S. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. **Plant J.**, v.22, p.327– 334, 2000.

YAO, Q.; SUN, T.T.; LIU, W.F.; CHEN, G.J (2008) Gene cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase, Swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 2, n. 11, p. 2799-2805, 2008.

YENNAWAR, N.H.; LI, L.C.; DUDZINSKI, D.M.; TABUCHI, A.; COSGROVE, D.J. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. **PNAS**, v. 103, n.40, p.14664–14671, 2006,

YOON, S.; DEVAIAH, S. P.; CHOI, S.-E.; BRAY, J.; LOVE, R.; LANE, J.; DREES, C.; HOWARD, J. H.; HOOD, E. E. Over-expression of the cucumber expansin gene (Cs-EXPA1) in transgenic maize seed for cellulose deconstruction. **Transgenic research**, v. 25, n. 2, p. 173-186, 2016. ISSN 0962-8819.

XIAO, Z., STORMS, R., TSANG, A. Microplate-based filter paper assay to measure total 1380 cellulase activity. **Biotechnol Bioeng**, v. 88, p.832-837, 2004.

ZAPAROLLI, D. Papel de bagaço e palha. Edição 263. Janeiro, 2018. Pesquisa FAPESP. <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2018/01/16/papel-de-bagaco-e-palha/>>

ZHOU, Q.; LV, X.; ZHANG, X.; MENG, X.; CHEN, G.; LIU, W. Evaluation of swollenin from *Trichoderma pseudokoningii* as a potential synergistic factor in the enzymatic hydrolysis of cellulose with low cellulase loadings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 1905-1910, 2011. ISSN 0959-3993.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A caracterização molecular de 256 fungos endofíticos de *P. cupana* e de 35 fungos endofíticos de *R. mangle* ampliou o conhecimento do inventário de gêneros até então descritos em associação com estas plantas tropicais. Os gêneros descritos pela primeira vez como componentes da comunidade fúngica associada ao guaranazeiro foram *Annulohyphoxylon*, *Cordyceps*, *Dokmaia*, *Eutypa*, *Lasiodiplodia*, *Neopestalotiopsis*, *Ophiocordyceps*, *Paraconiothyrium* e *Phialemonium*. Enquanto que fungos dos gêneros *Sarocladium* e *Trametes* foram pela primeira vez descritos em associação com mangue-vermelho.

A estratégia de prospecção utilizada, a qual foi baseada numa combinação de testes que incluíram a avaliação da capacidade de despolimerizar polissacarídeos, de produzir enzimas em meio à base de bagaço de cana pré-tratado e de desempenho do secretoma na hidrólise de biomassa foi uma abordagem útil para seleção de novos fungos produtoras de celulases e hemicelulases. Em especial, os melhores fungos selecionados com esta estratégia robusta pertencem à grupos que não têm sido tradicionalmente utilizados para produção industrial de enzimas (*Neofusicoccum ribis*; *Talaromyces amestolkiae*, *Annulohyphoxylon stygium*, *Neopestalotiopsis* sp., *Diaporthe citri*). Especificamente, o gênero *Neopestalotiopsis* foi pela primeira vez descrito como capaz de produzir celulases e hemicelulases, revelando-se como um bom produtor de β -glicosidase nas condições utilizadas (cultivo não otimizado).

Talaromyces amestolkiae CP230 foi selecionado para a produção de enzimas celulolíticas. O extrato enzimático bruto obtido pelo cultivo deste fungo em condições não otimizadas, tendo bagaço pré-tratado como fonte de carbono e farelo de trigo, foi capaz de converter biomassa lignocelulósica da cana em açúcares fermentescíveis e teve, nas condições avaliadas, desempenho semelhante ao coquetel comercial Cellic CTec 3, indicando-a como uma linhagem candidata para pesquisas futuras. Diferentes parâmetros de processo poderão ser otimizados visando maior produção de celulases; as enzimas produzidas poderão ter as propriedades bioquímicas melhor caracterizadas, possibilitando a definição das condições ótimas de atividade; este fungo poderá ser submetido à programas de melhoramento genético para aumentar a produção de celulases.

Expansinas de cana-de-açúcar foram produzidas pela primeira vez de forma recombinante. As β -expansinas SacEXP49 e SacEXP82 recombinantes foram capazes de se ligar à celulose microcristalina (Avicel PH-101) preferencialmente a 30°C e não apresentaram atividade hidrolítica sobre papel filtro. Portanto, uma avaliação da capacidade de ligação em outros substratos será fundamental para definição de sua especificidade.

As β -expansinas recombinantes SacEXP49 e SacEXP82 não tiveram efeito sinérgico com celulasas na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado pelo processo organosolv nas condições experimentais utilizadas (baixa carga enzimática e temperatura de 30°C). No entanto, elas foram capazes de modificar as propriedades físicas da celulose de papel filtro; seu desempenho na redução da força tênsil das fibras celulósicas foi tão eficiente quanto a uréia (controle positivo). Além disso, as cepas recombinantes de *Pichia pastoris* produtoras das expansinas de cana-de-açúcar são ativos tecnológicos e estão disponíveis para o desenvolvimento de processo otimizado de produção, o que por sua vez, permitirá novas aplicações dessas proteínas em diferentes áreas.

ANEXO

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos completos publicados em anais de congressos:

GREGORINE LF; MONCLARO, A. V. ; SILVA, C. O. G. ; Rodrigues, KB ; PEIXOTO, J. S. G. ; Abdelnur PV ; FÁVARO, LÉIA C.L. . Heterologous expression of a new lytic polysaccharide monoxygenase from *Hahella ganghwensis* and their functional characterization.. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 22.; SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 13., 2019, Uberlândia. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 22.; SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 13., 2019, Uberlândia, MG. [Anais ...]. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2019., 2019.

PEIXOTO, J. S. G. ; JARAMILLO, P. M. D. ; PEREIRA, V. M. ; TAMIETTI, M. S. ; Azevedo, J. L. ; PEREIRA, J. O. ; ASTOLFI FILHO, S. ; MELO, I. S. ; FÁVARO, LÉIA C.L. ; SILVA, F. M. . Endophytic fungi of *Paullinia cupana* and *Rhizophora mangle* and their potential for lignocellulolytic enzymes production.. In: XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS; XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2017, Aracajú, SE.. [Anais ...]. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2017.. Aracajú, 2017. p. Não paginado..

PEIXOTO, J. S. G. ; JARAMILLO, P. M. D. ; PEREIRA, V. M. ; SILVA, F. M. ; FÁVARO, LÉIA C.L. Bioprospecção de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* e *Rhizophora mangle* produtores de enzimas lignocelulolíticas.. In: IV Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia - IV EnPI, 2017, Brasília, DF.. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2017., 2017. p. 39-45.

Resumos publicados em anais de congressos:

PEIXOTO, J. S. G. ; MENDES, T. D. ; PACHECO, TF ; PEREIRA, V. M. ; TAMIETTI, M. S. ; AZEVEDO, J. L. ; PEREIRA, J. O. ; FÁVARO, LÉIA C.L. ; SILVA, F. M. . ENDOPHYTIC FUNGI OF *Paullinia cupana* AND *Rhizophora mangle* AND THEIR POTENTIAL FOR (HEMI)CELLULOLYTIC ENZYMES PRODUCTION USING PRETREATED SUGARCANE BAGASSE AS SUBSTRATE. In: 40th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2018, Clearwater. 40th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2018. p. 36013.

PEIXOTO, J. S. G. ; RODRIGUES, KB ; ANASTACIO, G. S. ; MENDES, T. D. ; GOMES, H. A. R. ; LOPES, R. S. ; GONCALVES, S. B. ; SILVA, F. M. ; FÁVARO, L. C. L. . Produção de uma β -expansina de cana-de-açúcar por *Komagataella phaffii*. In: V Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, 2018, Brasília. Anais do 5º Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, 9 a 10 de outubro de 2018 / Simone Mendonça, Hugo Bruno Correa Molinari, editores técnicos. Brasília, DF : Embrapa Agroenergia, 2018., 2018. p. 37.

PEIXOTO, J. S. G. ; PEREIRA, V. M. ; JARAMILLO, P. M. D. ; MIDORIKAWA, G. E. O. ; MELO, I. S. ; Azevedo, J. L. ; PEREIRA, J. O. ; SILVA, F. M. ; FÁVARO, L. C. L. . CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS

ENDOFÍTICOS DE *Paullinia cupana* var. *sorbilis* E *Rhizophora mangle*. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS., 2016, Curitiba. CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 4., 2016, Curitiba, PR. Recursos genéticos no Brasil: a base para o desenvolvimento sustentável. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2016. Não paginado., 2016.

Artigos aceitos para publicação:

PEIXOTO, J. S. G. ; RODRIGUES, KB ; SOUZA, A. A. ; PEREIRA, V. M. ; MENDES, T. D. ; ANDREANI, L. ; SILVA, C. O. G. ; ANASTACIO, G. S. ; VIDAL, J. F. D. ; GOMES, H. A. R. ; DIAS, B. B. A. ; KOBAYASHI, A. K. ; MOLINARI, H. B. C. ; Abdelnur PV ; VALADARES, L. F. ; GONCALVES, S. B. ; SALUM, THAÍS F.C. ; Damaso MCT ; RODRIGUES, D. S. ; SILVA, F. M. ; FÁVARO, L. C. L. . Recombinant sugarcane culm-specific β -expansins decrease the tensile strength of the cellulose fibers. *Biotechnology for Biofuels*, 2019.

PATENTES E REGISTROS

Depósito de pedido de patente:

FÁVARO LCL; RODRIGUES DS; DAMASO MCT; SALUM TFC; GONCALVES SB; MENDES TD; ANDREANI L; VALADARES LF; SILVA, FM; PEIXOTO JSG. POLINUCLEOTÍDEOS CODIFICANDO EXPANSINAS DE CANA-DE-AÇÚCAR, MICRORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO, PROCESSO PARA PRODUZIR UMA EXPANSINA, PREPARAÇÃO PROTEICA, USO DA PREPARAÇÃO PROTEICA, E PROCESSO PARA PRODUZIR UM MICRORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190214805. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 11/10/2019. Instituição(ões) financiadora(s): Embrapa.

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF A NEW LYTIC POLYSACCHARIDE MONOOXYGENASE FROM *Hahella ganghwensis* AND THEIR FUNCTIONAL CHARACTERIZATION

Lucas F. Gregorine¹, Antonielle V. Monclaro¹, Caio O. G. Silva¹, Kelly B. Rodrigues¹, Jéssica S. G. Peixoto^{1;2}, Patrícia V. Abdelnur¹ and Léia C. L. Fávaro¹

¹ Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Agroenergy, Brasília, DF, Brazil. ² University of Brasília, Chemistry Institute, Brasília, DF, Brazil.

E-mail: leia.favaro@embrapa.br

ABSTRACT

The powerful class of oxidative enzymes, lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) - also named Auxiliary Activity (AA) - are able to oxidize recalcitrant polysaccharides on lignocellulosic biomass. In this work, we successfully expressed three catalytic domains from bacterial LPMOs in the yeast *Komagataella phaffii*: domain MdAA10.1-SD (from *Moritella dasanensis*), domain VmAA10.2-SD (from *Verrucospora maris*), and domain HgAA10.1-SD (from *Hahella ganghwensis*). Heterologous expression was analyzed by SDS-PAGE, Western-Blot, and Dot-Blot, while functional activity of these proteins was investigated by a combination of mass spectrometric and chromatographic methods. The recombinant LPMO catalytic domain HgAA10.1-SD from *H. ganghwensis*, a C1-oxidizer, was able to promote an oxidative cleavage of phosphoric-acid swollen cellulose (PASC) substrate in the presence of ascorbic acid as an electron donor, showing its potential for cellulose depolymerization.

1. INTRODUCTION

The copper-dependent LPMOs are essential for the deconstruction of recalcitrant lignocellulosic biomass. They are able to boost biomass degradation through synergism with hydrolytic enzymes (Bissaro et al., 2018). Currently, there are seven classes of LPMOs, also named Auxiliary Activity (AA) according to the classification of the Carbohydrate-active enzymes database (CAZy; <http://www.cazy.org>) (AA9, AA10, AA11, AA13, AA14, AA15, and AA16). Their mode of action is copper-based and differs mainly on substrate specificity and regioselectivity. AA10 family, formerly CBM33, have been shown to act on chitin and cellulose, the two most abundant polysaccharides in nature, and are found mainly in bacteria (Bissaro et al., 2018). In the context of green chemistry and circular bioeconomy, more attention should be given to rationalizing the customization of enzymatic cocktails in the lignocellulosic biorefinery industry, as protein loading and pretreatment are the bottlenecks for achieving a sustainable and economic process for biomass degradation (Monclaro & Filho, 2017). Based on this, in-depth knowledge about LPMOs is essential for a rational application in lignocellulosic biorefineries. In the present work, we investigated the heterologous expression and functional characterization of three new bacterial LPMOs, using the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* as an expression host.

2. MATERIAL AND METHODS

The genes encoding only the single AA10 catalytic domain of LPMOs from *V. maris* (VmAA10.2-SD; GenBank AEB43663.1), *M. dasanensis* (McAA10.1-SD; GenBank WP_017222644.1), and *H.*

ganghwensis (*HgAA10.1-SD*; GenBank WP_020410109.1) were artificially synthesized (GenOne, Brazil). The gene constructions were obtained with native gene sequence, with the α -factor secretion signal, and with a histidine tag in the C-termini of the protein. The methylotrophic yeast *K. phaffii* was used as expression host (Rodrigues et al., 2017). pGAPZ α A was the selected plasmid for *VmAA10.2-SD* and *McAA10.1-SD* catalytic domains, and pPICZ α A for *HgAA10.1-SD* catalytic domain. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* TOP10 through electroporation. For DNA plasmidial extraction, PureLink Genomic DNA Kit (Thermo Scientific) was used. *K. phaffii* transformants resistant to zeocin were analyzed using a colony PCR procedure in order to confirm the presence of the gene in the genome of the yeast. Based on the positive result of this PCR, 1-5 transformants were screened for protein production in BMGY (*VmAA10.2-SD* and *MdAA10.1-SD*) or BMMY (*HgAA10.1-SD*) culture media. The cells were harvested by centrifugation and stored at 4°C. The supernatants were analyzed by SDS-PAGE, Western blot, and dot blot protocols. *HgAA10.1-SD* was purified using a one-step purification protocol using a Ni-NTA Purification System (Thermo Scientific). *HgAA10.1-SD* fractions were pooled, dialyzed against water, and concentrated to 2 mL using a VivaSpin® 500 (MWCO 3 kDa, GE Healthcare). The molecular weight and purity of the enzyme was analyzed by MALDI-TOF MS. Enzyme sample and sinapinic acid (20 mg/mL prepared in 30% acetonitrile) at 1:3 proportion (v:v) were added to a MPT 384 target plate ground steel BC (Bruker Daltonics). Analysis was performed in an UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics) operated in Linear Positive mode. *HgAA10.1-SD* was assayed for activity on phosphoric acid swollen cellulose - PASC (0.2%) using ascorbic acid (1mM) as an electron donor, at 50°C and 14000 rpm for 48h. LPMO reaction products on PASC were analyzed by HILIC-UHPLC-ESI-MS in a Shimadzu Nexera X2 UHPLC system (Kyoto, Japan) equipped with an Acquity UPLC BEH Amide column and VanGuard BEH Amide precolumn (Waters, Milford, USA), coupled to a ESI-Q-TOF mass spectrometer (maXis 4G TM MS, Bruker Daltonics, Germany) operated in negative ion mode. The LC-MS method was based on previous studies (Boulos & Nyström, 2016).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The LPMO from *V. maris* (*VmAA10.2-SD*) presents a C-terminal CBM2 domain and have a theoretical molecular mass of 21.33 kDa; *MdAA10.1-SD* and *HgAA10.1-SD* are single-domain AA10 LPMOs and have theoretical molecular mass of 18.79 kDa and 18.71 kDa, respectively (Figure 1A). We selected only the catalytic domain (AA10) from these LPMOs, and the three enzymes were successfully expressed in *K. phaffii*, as confirmed by immunodetection using antibodies raised against the poly-HIS tag. For *VmAA10.2-SD* and *MdAA10.1-SD*, dot blot was performed (Figure 1B); for *HgAA10.1-SD*, Western blot was performed and showed a band with higher molecular mass (~28 kDa) compared to the theoretical one (Figure 1C), likely due to glycosylation. Through MALDI-TOF MS, the purity of the enzyme and the molecular mass could be confirmed as 28.04 kDa (Figure 1D).

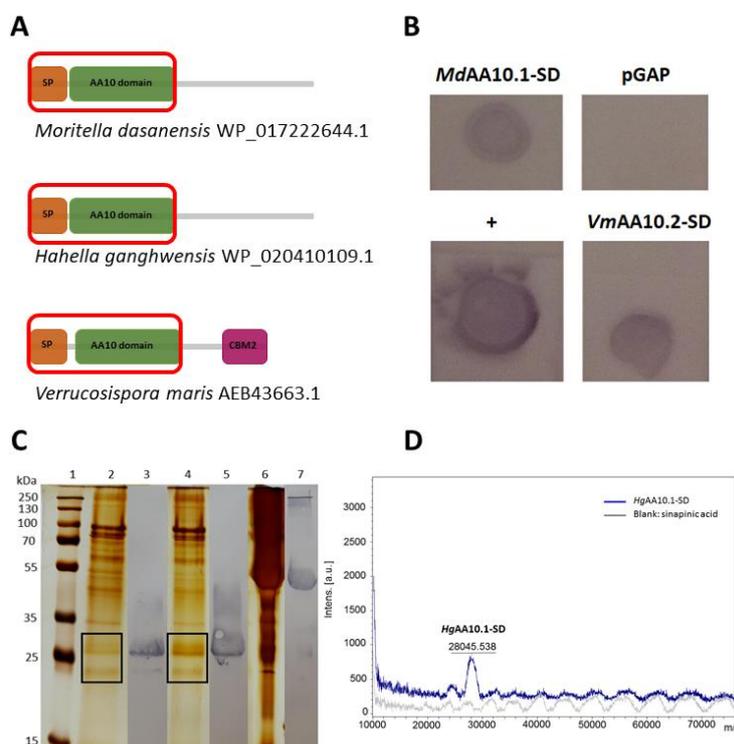


Figure 1. Characterization of three recombinant catalytic domains of LPMOs from the bacteria *M. dasanensis* (MdAA10.1-SD), *V. maris* (VmAA10.2-SD), and *H. ganghwensis* (HgAA10.1-SD). **A)** Representation of the modularity of the enzymes. In red: the signal peptide (SP) and catalytic domain of AA10 LPMOs that were synthesized. **B)** Dot blot of supernatant of *K. phaffii* transformants producing MdAA10.1-SD and VmAA10.2-SD LPMOs: (+) - Positive Control; pGAP - Empty vector, negative control. **C)** SDS-PAGE and Western blot of HgAA10.1-SD. 1 - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); 2 and 4 – Supernatant from *K. phaffii* transformants producing HgAA10.1-SD LPMO (colonies 2 and 10, respectively); 3 and 4 – immunodetection using antibodies against the poly-HIS tag (colonies 2 and 10, respectively); 6 and 7 – Positive control. **D)** MALDI-TOF MS of purified HgAA10.1-SD and a blank sample corresponding to sinapinic acid matrix.

HILIC-UHPLC-ESI-MS analysis suggests that HgAA10.1-SD displayed oxidative activity on PASC (Figure 2). Native and C1-oxidized cello-oligosaccharides were released in the presence of ascorbic acid, suggesting C1-regioselectivity. Even though ions having m/z values 16 units superior to native oligosaccharides (e.g. DP2 [m/z 341.108] and DP2_{ox} [m/z 357.103]) may correspond to both C1- (aldonic acid form) and C4-oxidized (gemdiol form) oligosaccharides, they most likely correspond to the C1-oxidized products, for two main reasons: 1) they display a chromatographic behavior similar to glucuronic acid (a carboxylic acid analogous to aldonic acids); 2) the LC-MS method employed favors the detection of C1-oxidized products in the aldonic acid form [M+16Da] and the C4-oxidized products in the ketoaldose form [M-2Da] (Boulos & Nyström, 2016). In the absence of ascorbic acid, small amounts of native oligosaccharides were released by HgAA10.1-SD activity on PASC, suggesting a possible *K. phaffii* endogenous endoglucanase contaminant in the preparations, or a low hydrolytic activity of the heterologous enzyme. In summary, this work showed for the first time that the HgAA10.1-SD LPMO from *H. ganghwensis* can be secreted by *K. phaffii* cells in its functional form. The production of this enzyme could be optimized for different applications, such as saccharification of lignocellulosic biomass, as a technology for increasing forage fiber utilization, production of cellulose nanofibers, among other industrial applications.

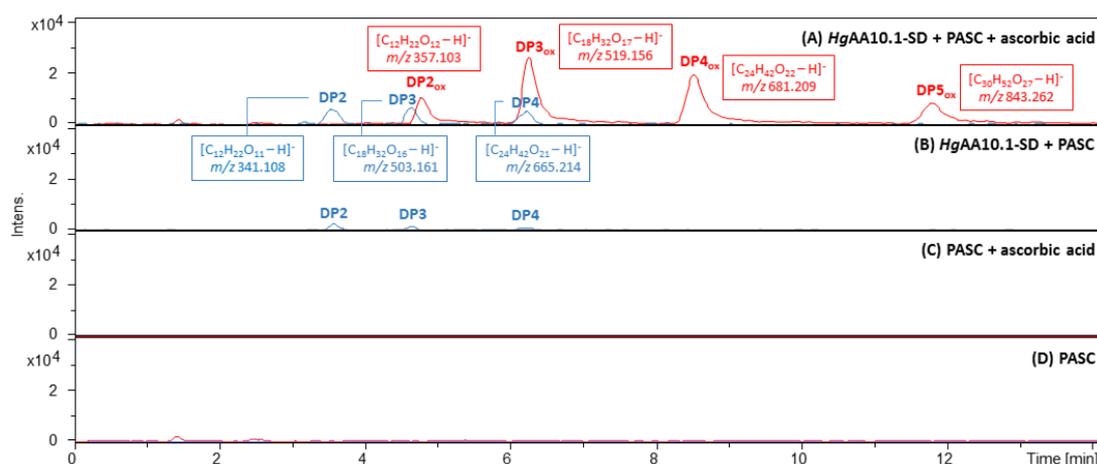


Figure 2. HILIC-UHPLC-ESI-MS of the HgAA10.1-SD (1 μ M) cleavage products on PASC (0.2%) using ascorbic acid (1mM) as an electron donor (A). Assays in the absence of enzyme and/or ascorbic acid were also performed (B, C and D). Lines in blue refer to the extracted ion chromatograms (EIC) of ions corresponding to native cello-oligosaccharides (DP2 – DP4). Lines in red refer to the EIC of ions corresponding to oxidized cello-oligosaccharides (DP2_{ox} – DP5_{ox}), having m/z values 16 units superior to their native counterparts.

5. REFERENCES

- Bissaro, B., Várnai, A., Røhr, Å.K., Eijsink, V.G.H., 2018. Oxidoreductases and reactive oxygen species in conversion of lignocellulosic biomass. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82, 1–51.
- Boulos, S., Nyström, L., 2016. UPLC-MS/MS investigation of β -glucan oligosaccharide oxidation. *Analyst* 141, 6533–6548.
- Monclaro, A.V., Filho, E.X.F., 2017. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9 : Recent developments and application in lignocelullose breakdown. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 771–778.
- Rodrigues, K.B., Macêdo, J.K.A., Teixeira, T., Barros, J.S., Araújo, A.C.B., Santos, F.P., Quirino, B.F., Brasil, B.S.A.F., Salum, T.F.C., Abdelnur, P. V., Fávoro, L.C.L., 2017. Recombinant expression of *Thermobifida fusca* E7 LPMO in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* and their functional characterization. *Carbohydr. Res.* 448, 175–181.