



UnB

**Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em
Biologia Molecular**

**Revelando o potencial de *Clonostachys byssicola* em
produzir enzimas holocelulolíticas**

Helder Andrey Rocha Gomes

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Brasília, Outubro/2017



UnB

**Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em
Biologia Molecular**

**Revelando o potencial de *Clonostachys byssicola* em
produzir enzimas holocelulolíticas**

Helder Andrey Rocha Gomes

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Brasília, Outubro/2017

Revelando o potencial de *Clonostachys byssicola* em produzir enzimas holocelulolíticas

Helder Andrey Rocha Gomes

Banca Examinadora:

- ✓ **Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller – Membro interno (UnB)**
- ✓ **Dr^a. Ângela Mehta dos Reis – Membro Externo (Embrapa CENARGEN)**
- ✓ **Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães – Membro externo (UnB)**
- ✓ **Dr. Samuel Coelho Mandacaru – Membro Suplente (UnB)**
- ✓ **Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho – Presidente (UnB)**

Brasília, Outubro/2017

Agradecimentos

À Deus, que esteve sempre comigo.

Aos meus pais, em especial à minha Mãe Dione, que acreditou nesta empreitada desde o início.

Ao meu orientador, Prof. Edivaldo Ximenes, que prontamente me aceitou no laboratório, e não mediu esforços para transmitir seu conhecimento. Agradeço pela confiança e pela paciência.

Ao meu co-orientador, Prof. Carlos André Ricart, pela valiosa contribuição nos experimentos de proteômica. Agradeço pelos momentos divertidos, e pelo conhecimento transmitido.

Aos meus colegas do Laboratório de Enzimologia. Caio, Antonielle, Diandra, Carol, Pedro Fontes, Andreza, Raíssa, Alisson, Guilherme, Guilherme Recalde, Bárbara, Leonora, Elenilde (Fá), Jade: agradeço pelos momentos divertidos, pelo companheirismo e pelo apoio. Aprendi muito com todos vocês, e sou muito grato por isso! Agradeço à Paula Jaramillo e à Leonora, que desde o início me ensinaram os procedimentos mais básicos. Agradeço também aos colegas Francilene (Fran), Benda, Alonso, Sádía, Jéssica, Débora, Hamille, Daniel (Rafael), Filipe, Gabrielle, Jovane, Juliana Peixoto, Paula Istvam, Samuel, Elisa, Fabiano, Taís, Renata, Raul e Cláudia, pelos momentos divertidos e pelo companheirismo. Agradeço especialmente à Renata, que prontamente se disponibilizou para realizar as análises no DBCan, e a busca por peptídeos sinais. Agradeço à Diandra, pelo apoio na etapa final deste trabalho. Meu apreço à Fran, Raíssa e Carol pelos bons papos, e pela confiança. Guilherme, obrigado por ter me aturado enquanto nós dividíamos a bancada. Agradeço pelo companheirismo, e pelo repertório de palavras e frases nobres com o qual você nos prestigiou e influenciou. Ao longo dessa sua jovem vida científica, quando for escolher os resíduos agrícolas para trabalhar, lembre-se que *“é o sabugo que dá o grau”*.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP), por terem me recebido tão bem, e por me ensinarem com tão boa vontade. Obrigado Carol, Artur, Samuel, Reynaldo, Jaques, Nuno, Micaella,

Aline Martins, Simone e Marina. Agradeço ao Nicholas e à Mariana, pelo apoio nos diversos experimentos relacionados aos complexos. Agradeço, em especial, ao Agenor, pela valiosa ajuda em todos os experimentos de proteômica e espectrometria de massas, e pelos momentos divertidos. Sem sua ajuda, Agenor, eu não teria conseguido! Agradeço ao Prof. Wagner, pela orientação nas análises de proteômica quantitativa. Agradeço também ao Prof. Adelson Joel, hoje na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), por ter confiado em mim quando começamos a trabalhar com complexos enzimáticos.

Agradeço à Prof^a. Nádia Parachin por ter me aceitado em seu laboratório para realizar os experimentos de expressão em *Pichia pastoris*. Seus alunos me acolheram tão bem, que não poderia deixar de agradecê-los. Obrigado Milton, Kelly, Nadielle, Thaís, Gabi, Fábio, Guilherme e Priscila.

Agradeço às técnicas Marísia e Margarete pelo apoio e momentos divertidos. Agradeço à técnica Maria do Desterro, do Laboratório de Bioquímica da Nutrição (Faculdade de Nutrição), por ter sido tão gentil e por ter viabilizado o uso da mufla.

Agradeço às secretárias Luciana e Ana, pelo bom atendimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular (PPGBiomol), e à Universidade de Brasília, pela estrutura e pelos recursos financeiros. Agradeço também aos professores do programa, pelos momentos divertidos, e pelo conhecimento transmitido, tanto nas disciplinas quanto em outros momentos.

Aos meus amigos que, mesmo distantes, me incentivaram e me apoiaram durante o período do doutorado. Obrigado, S. Alisson.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi desenvolvido com suporte financeiro do CNPq, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (INCT Bioetanol), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, PRONEX 0193.001195/2016).

Sumário

Lista de figuras	10
Lista de Tabelas	13
Resumo	14
Abstract	15
Capítulo 1	16
Introdução, objetivo geral e revisão bibliográfica.....	16
Introdução	17
Objetivo Geral	19
Objetivos Específicos.....	19
Revisão Bibliográfica	19
Parede Celular.....	19
Celulose: estrutura e biossíntese	22
Hemiceluloses: estrutura e biossíntese.....	24
Pectina: estrutura e biossíntese	28
Lignina: estrutura e biossíntese	32
Parede celular vegetal, recalcitrância e pré-tratamento	34
Degradação enzimática da holocelulose: características gerais	38
Celulases.....	41
Hemicelulases	44
Pectinases	46
Holocelulases fúngicas	49
Clonostachys	51
Referências.....	54
Capítulo 2	67
Identificação de complexos multienzimáticos em secretomas de <i>Clonostachys</i> <i>byssicola</i> produzidos em resposta a diferentes fontes de carbono lignocelulósicas. ...	67
Introdução	68
Capítulo 3	77
Caracterização do secretoma de <i>Clonostachys byssicola</i> cultivado em diversas fontes de carbono.....	77
Introdução	78
Objetivo Geral	80
Objetivos Específicos	80
Material e Métodos.....	80
Reagentes	80
Cultivo do fungo.....	80

Caracterização dos Extratos Brutos.....	81
Caracterização dos secretomas por espectrometria de massas	82
LC-MS/MS	83
Identificação das proteínas	84
Quantificação relativa (Label Free)	85
Pré-tratamento.....	85
Determinação da composição dos resíduos lignocelulósicos.....	85
Sacarificação	86
Estabilidade de xilanases e celulases ao longo sacarificação.....	87
Determinação dos açúcares redutores totais	87
Determinação do teor de pentoses totais.....	87
Determinação do teor de glicose	88
Avaliação dos produtos de hidrólise por HPLC-DIONEX	88
Resultados	89
Caracterização do secretoma de <i>C. byssicola</i>	89
Potencial dos secretomas para hidrólise de biomassa.....	106
Composição das biomassas lignocelulósicas submetidas à sacarificação	106
Hidrólise enzimática.....	108
Discussão.....	113
Conclusões	120
Perspectivas Futuras.....	120
Referências.....	122
Capítulo 4	126
Produção de enzimas pectinolíticas por <i>Clonostachys byssicola</i> em casca de laranja.	126
Introdução	127
Objetivo.....	128
Objetivos específicos	128
Material e Métodos.....	129
Reagentes Químicos e substrato lignocelulósico	129
Meio de cultura.....	129
Efeito da fonte de nitrogênio	131
Curva de indução.....	132
Ensaio Enzimáticos.....	132
Pectinase.....	132
Pectato Liase.....	132
Caracterização do secretoma de <i>C. byssicola</i>	133
LC-MS/MS	134

Identificação das proteínas	135
Purificação parcial de pectinases.....	135
Eletroforese e Zimograma	136
Efeito de temperatura e pH.....	136
Identificação de uma das pectinases parcialmente purificadas	137
Clonagem e expressão de uma das pectinases parcialmente purificadas.....	138
Extração de RNA total	138
Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	139
Digestão, ligação e transformação de Escherichia coli XL10 Gold.....	139
Extração de DNA plasmidial em média escala (midprep).....	143
Transformação de Pichia pastoris X-33	144
Screening da produção de pectinase	145
Padronização do meio de cultura e da fonte de nitrogênio.....	146
Curva de indução enzimática.....	150
SDS-PAGE e Zimograma	150
Caracterização do secretoma	152
Ultrafiltração e Cromatografia	153
Identificação de uma pectinase parcialmente purificada por LC-MS/MS.....	158
Conclusões	163
Perspectivas.....	164
Referências.....	165
Considerações finais e perspectivas.....	168
Anexo A.....	171
Tabelas referentes ao capítulo 3.....	171
Anexo B.....	194
Tabelas referentes ao capítulo 4.....	194
Anexo C.....	210
The Role of Fungal Transcriptome Analysis and Side-Chain Hydrolyzing Enzymes in Sugarcane Bagasse Breakdown.....	210
Anexo D.....	213
Enzymes and Food Industry: A Consolidated Marriage.....	213

Lista de figuras

- Figura 1.1.** Estrutura geral da parede celular vegetal. Extraído e adaptado de (Siqueira and Ferreira Filho, 2010).....**20**
- Figura 1.2.** Estruturas propostas para a microfibrila de celulose: (a) 36 cadeias de glicano, em formato hexagonal; (b) 24 cadeias de glicano, em formato de diamante; (c) 24 cadeias de glicano, em formato retangular; (d) e (e): duas versões de 18 cadeias de glicano. As linhas vermelhas representam as faces hidrofóbicas, que variam em área de acordo com o modelo proposto. Extraído de Cosgrove, (2014).....**23**
- Figura 1.3.** Estrutura geral das hemiceluloses. Extraído e adaptado de (Scheller and Ulvskov, 2010).....**27**
- Figura 1.4.** Estrutura da pectina, mostrando os principais domínios do polissacarídeo. Extraído de Albuquerque et al., (2016).....**30**
- Figura 1.5.** Modelos de interação iônica presentes na pectina. (a) Interação entre cadeias de homogalacturonana mediada por íons de cálcio, segundo o modelo “caixa de ovos” (extraído de Caffall and Mohnen, (2009). (b) Interação entre cadeias de ramnogalacturonana II mediada por íons borato (extraído de Ridley et al., (2001).....**31**
- Figura 1.6.** Via de síntese dos monômeros constituintes da lignina. Extraído de Miedes et al., (2014).....**33**
- Figura 1.7.** Mecanismos gerais de reação empregados pelas glicosil-hidrolases: retenção (a) ou inversão (b) da posição da hidroxila do carbono anomérico Extraído de Dodd and Cann, (2009).....**39**
- Figura 1.8.** Elenco de enzimas hidrolíticas e oxidativas responsáveis pela degradação da celulose. Legenda: PMO: monooxigenase de polissacarídeos. CBH: celobiohidrolase. CDH: celobiose-desidrogenase. Extraído de Beeson et al., (2015).....**41**
- Figura 1.9.** Enzimas envolvidas na degradação da xilana. O nome das enzimas está acompanhado das respectivas famílias do CAZy. Extraído de Dodd and Cann, (2009).....**45**
- Figura 1.10.** Mecanismo de reação proposto para uma pectato liase de *Bacillus subtilis*. Extraído de Ma et al., (2016).....**48**
- Figura 1.11.** (a) Colônia de *C. byssicola* em ágar batata dextrose (BDA), incubada a 28°C durante 15 dias, e com fotoperíodo de 12 horas. (b) Conidiósporos de *Clonostachys byssicola* (aumento de 800x).....**53**
- Figura 3.1.** Perfil de atividades enzimáticas monitorado durante o cultivo de *Clonostachys byssicola* em diversas fontes de carbono para a caracterização de secretoma. Os valores são apresentados acompanhados das barras de desvios-padrão. Foram avaliados os níveis de mananase (a), xilanase (b), CMCCase (c) e pectinase (d). Fontes de carbono indutoras: xilana de aveia (→), Avicel (→), CMC (→), sabugo de milho (→), casca de soja (→), engaço de bananeira (→) e bagaço de cana-de-açúcar (→).....**90**
- Figura 3.2.** Composição geral do secretomas obtidos após o crescimento de *Clonostachys byssicola* em Avicel (a), CMC (b), xilana de aveia (c), sabugo de milho (d), engaço de bananeira (e), bagaço de cana-de-açúcar (f) e casca de grão da soja (g). A pizza secundária refere-se à composição das enzimas envolvidas na degradação de carboidratos (identificadas coletivamente como CAZy).....**92**
- Figura 3.3** Termoestabilidade das atividades de xilanase (a) e CMCCase (b) monitoradas durante a sacarificação. Legenda: sabugo (→), engaço (→), bagaço (→) e casca de soja (→).**109**

Figura 3.4. Monitoramento dos produtos liberados durante a sacarificação de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. Os valores são apresentados acompanhados das respectivas barras de desvio-padrão. (a) e (b): açúcares redutores totais liberados durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente; (c) e (d): pentoses totais determinadas durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente. (e) e (f): teor de glicose monitorado durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente. Legenda: sabugo (), engaço (), bagaço () e casca de soja ()..... **110**

Figura 3.5. Concentração dos principais produtos de hidrólise detectados durante a sacarificação do sabugo de milho e do bagaço de cana-de-açúcar, determinada por meio de HPLC-PAD. Os valores são apresentados acompanhados dos respectivos desvios-padrão. (a) e (b): concentrações de glicose detectadas durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente; (c) e (d): evolução das concentrações de celobiose durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente; (e) e (f): concentrações de xilobiose medidas durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente; (g) e (h): concentrações de manose aferidas durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente. Legenda: sabugo (), engaço (), bagaço () e casca de soja ()..... **112**

Figura 4.1. Esquema do plasmídeo pGAPZαA..... **142**

Figura 4.2. Produção de pectinases (a) e pectato liases (b) por *Clonostac. byssicola* cultivado em três diferentes meios: mínimo mineral (MM), TLE e Mandels & Weber (MW). As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95% **148**

Figura 4.3. Efeito de diversas fontes de nitrogênio sobre a produção de pectinases (a) e pectato liases (b) por *Clonostachys byssicola* crescido em meio MW durante 7 dias. Fontes de nitrogênio utilizadas: sulfato de amônio, nitrato de sódio, extrato de levedura, triptona e uréia. As barras representam os intervalos de confiança a 95%..... **149**

Figura 4.4. Produção de pectinases durante o crescimento de *Clonostachys byssicola* em meio MW, contendo casca de laranja como única fonte de carbono. São apresentados os níveis de atividade de pectinase (azul) e pectato liase (vermelho). As barras indicam os desvios-padrão..... **151**

Figura 4.5. Perfil eletroforético das proteínas presentes no extrato bruto obtido após o cultivo de *Clonostachys byssicola* em meio MW contendo casca de laranja como única fonte de carbono, durante 4 dias. Os números se encontram nas posições dos marcadores moleculares. A zimografia exibindo as bandas com atividade pectinolítica é apresentada ao lado do gel.... **151**

Figura 4.6. Cromatograma do extrato bruto concentrado aplicado em coluna SPFF. Foram aplicados 5 mL de amostra, e coletados 5 mL por fração. A cromatografia foi realizada com fluxo de 30 mL/h, e o gradiente foi estabelecido com tampão contendo NaCl 1 M. São apresentados os valores de concentração total de proteínas (linha azul), atividades de pectinase (linha vermelha), mananase (linha preta), xilanase (linha rosa) e CMCCase (linha verde). O gradiente é representado pela linha cinza..... **154**

Figura 4.7. Efeito da temperatura (a) e do pH (b) sobre a pectinase parcialmente purificada após cromatografia em SPFF. As barras representam os respectivos desvios-padrão. Para o efeito do pH, foram utilizados tampões a base de acetato (linha azul), fosfato (linha vermelha) e Tris (linha verde)..... **156**

Figura 4.8. Cromatograma da fração contendo a pectinase parcialmente purificada aplicada em coluna contendo ConA sefarose. A cromatografia foi realizada com fluxo de 30 mL/h, e o gradiente foi estabelecido com tampão contendo metilglicose 0,5 M. São apresentados os valores de concentração total de proteínas (linha azul) e atividade de pectinase (linha vermelha). O gradiente é representado pela linha verde..... **157**

- Figura 4.9.** Gel de SDS-PAGE ilustrando o perfil de proteínas ao longo das etapas de purificação das pectinases produzidas por *Clonostachys byssicola*: fração concentrada da ultrafiltração (C50); frações coletadas antes (SPPG) e durante (SPG) o gradiente na cromatografia em SPFF; e frações coletadas antes (CPG) e durante (CG) o gradiente da cromatografia em ConA sefarose. A primeira coluna corresponde ao marcador molecular..... **157**
- Figura 4.10.** Transcrito predito para a endopoligalacturonase (BN869_T00000016_1) identificada a partir da fração semi-purificada após cromatografia em SPFF. As sequências em amarelo representam regiões não-transcritas. As sequências destacadas em verde correspondem ao peptídeo sinal..... **158**
- Figura 4.11.** Produto da PCR realizada utilizando-se os primers específicos para a endopoligalacturonase parcialmente purificada após cromatografia em SPFF e o cDNA obtido após o cultivo de *C. byssicola* em casca de laranja durante 4 dias..... **159**
- Figura 4.12.** Perfil das amostras de DNA plasmidial extraídas de 4 clones (C1, C4, C5 e C6) de *Escherichia coli* XL10 *Gold* selecionados após a transformação. São apresentados (a) o tamanho dos plasmídeos obtidos em comparação ao vetor sem inserto (C-) e (b) os produtos de digestão obtidos após o tratamento das amostras com *EcoRI* e *XbaI*..... **160**
- Figura 4.13.** Resultado da PCR das colônias transformadas de *Pichia pastoris* X-33 utilizando os primers específicos para o inserto. C+ e C- representam o plasmídeo pGAPZαA com e sem o inserto, respectivamente..... **161**
- Figura 4.14.** Teste de halo de atividade pectinolítica para os isolados transformados de *Pichia pastoris* X-33..... **161**
- Figura 4.15.** Crescimento dos isolados 7, 9, 13, 14 e 17, e do controle negativo (C-), expresso em termos de OD (600 nm), cultivados em meio YNB contendo glicerol 10% como fonte de carbono..... **162**
- Figura 4.16.** Perfil proteico das amostras coletadas no último ponto da curva de crescimento de alguns dos clones transformados de *P. pastoris* crescidos em YNB contendo 10% de glicerol. São apresentados os perfis do sobrenadante (a) e das proteínas extraídas do precipitado de células (b)..... **163**

Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Enzimas relacionadas à degradação ou modificação de glicanos identificadas nos secretomas de <i>Clonostachys byssicola</i> cultivado em diversos substratos lignocelulósicos.....	94
Tabela 3.2. Enzimas relacionadas à degradação de pectina identificadas nos secretomas de <i>Clonostachys byssicola</i> cultivado em diversos substratos lignocelulósicos.....	94
Tabela 3.3. Enzimas relacionadas à degradação de diferentes frações de hemicelulose nos secretomas de <i>Clonostachys byssicola</i> cultivado em diversos substratos lignocelulósicos.....	95
Tabela 3.4. Outras enzimas identificadas nos secretomas de <i>Clonostachys byssicola</i> cultivado em diversas fontes de carbono lignocelulósicas.....	96
Tabela 3.5. Representação esquemática do número de proteínas classificadas em famílias do CAZy identificadas em cada um dos secretomas de <i>Clonostachys byssicola</i> . O número de proteínas relaciona-se à coloração da célula, sendo a escala crescente representada por tons de verde a vermelho.....	100
Tabela 3.6. Abundância das carboidrases presentes nos diversos secretomas. A análise estatística foi feita em comparação ao secretoma de Avicel. As setas para baixo indicam abundância significativamente maior no secretoma de Avicel, enquanto que as setas para cima indicam abundância significativamente maior no secretoma comparado ($p < 0,05$).....	104
Tabela 3.7. Abundância das carboidrases presentes nos diversos secretomas. A análise estatística foi feita em comparação ao secretoma de xilana de aveia. As setas para baixo indicam abundância significativamente maior no secretoma de Avicel, enquanto que as setas para cima indicam abundância significativamente maior no secretoma comparado ($p < 0,05$).....	105
Tabela 3.8. Perfil enzimático dos secretomas de <i>Clonostachys byssicola</i> obtidos sob indução em fontes de carbono lignocelulósicas. Os valores de atividades (em U./mL) estão acompanhados dos respectivos desvios-padrões.....	106
Tabela 3.9. Composição química do sabugo de milho e do bagaço de cana antes e após o pré-tratamento com hidróxido de amônio. Todos os valores representam percentuais (%)......	107
Tabela 4.1. Composição do meio Mínimo Suplementado.....	130
Tabela 4.2. Composição do meio mineral de Mandels & Weber.....	130
Tabela 4.3. Composição do meio TLE.....	131
Tabela 4.4. Ultrafiltração do extrato bruto em membrana de 50 kDa. Os valores de atividade são apresentados juntamente com os respectivos desvios-padrão.....	153
Tabela A1. Agrupamento das proteínas em função do secretoma. As proteínas foram agrupadas a partir do respectivo número de acesso, através de uma ferramenta online (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/).....	172
Tabela A2. Descrição das famílias CAZy identificadas nos secretomas de <i>Clonostachys byssicola</i> . AA=Atividade auxiliar; CE=Esterase de carboidratos; GH= Glicosil-hidrolases; e PL= Polissacarídeo liases. Fonte: CAZy.....	191
Tabela B.1. Proteínas identificadas no secretoma de <i>C. byssicola</i> obtido após cultivo em meio contendo casca de laranja como única fonte de carbono.....	195
Tabela B.2. Peptídeos identificados a partir da banda de SDS-PAGE mais abundante presente na fração SPG, eluída durante o gradiente em SPFF.....	202

Resumo

Os fungos filamentosos saprofiticos representam fontes promissoras de enzimas holocelulolíticas, e o cultivo desses organismos em fontes de carbono indutoras baratas, como resíduos agrícolas, permitiria a obtenção de coquetéis enzimáticos com custos reduzidos. Neste trabalho, o potencial de um isolado de *Clonostachys byssicola* para a produção de enzimas holocelulolíticas é descrito. A avaliação do secretoma produzido pelo fungo em cultivo submerso com diversas fontes de carbono lignocelulósicas através de eletroforese em BN-PAGE revelou a presença de bandas de alta massa molecular, correspondentes à complexos proteicos putativos. A partir da identificação desses complexos por LC-MS/MS, verificou-se que os complexos abrigam diversas enzimas envolvidas na degradação de holocelulose, como celulasas, mananases, xilanasas e pectinases. Os complexos também são cataliticamente ativos, uma vez que foi possível identificar atividade enzimática *in gel*. Em outra etapa do trabalho, o secretoma do fungo obtido em fontes de carbono comerciais (Avicel, carboximetilcelulose-CMC e xilana de aveia) e agroindustriais (sabugo de milho, casca do grão de soja, engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar) foi caracterizado por LC-MS/MS. A maior diversidade de proteínas foi identificada no secretoma obtido em Avicel, seguido pelo secretoma obtido em sabugo de milho. Foram identificadas várias enzimas relacionadas à degradação da lignocelulose, o que evidencia que o fungo é capaz de produzir sistemas enzimáticos completos específicos para cada uma das principais frações da holocelulose: celulose, hemiceluloses e pectina. Os secretomas obtidos em resíduos agroindustriais foram empregados para sacarificar sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar parcialmente delignificados. Os extratos brutos produziram mais açúcares a partir da hidrólise do sabugo, revelando uma maior digestibilidade deste substrato quando comparado ao bagaço, o que pode decorrer do menor teor de lignina observado após o tratamento do sabugo de milho. Os secretomas permitiram a solubilização de grande parte da xilana presente no sabugo de milho, com a liberação de xilobiose como principal produto de hidrólise. O isolado de *C. byssicola* foi ainda avaliado quanto à capacidade de produção de enzimas pectinolíticas quando cultivado em meio contendo casca de laranja como única fonte de carbono. O fungo foi capaz de secretar pectinases e pectato liases. A caracterização do secretoma feita por LC-MS/MS revelou uma grande diversidade de enzimas atuantes na cadeia principal e sobre substituintes laterais. Uma fração parcialmente purificada foi caracterizada quanto ao efeito da temperatura e pH, e a atividade de pectinase foi máxima a 50°C, e na faixa de pH entre 4,5 e 6,0. Estas características sugerem a aplicação da enzima para o tratamento de sucos de frutas com baixa acidez. Uma das enzimas parcialmente purificada foi identificada por LC-MS/MS, e a partir desta identificação, o transcrito correspondente foi clonado com sucesso em *Escherichia coli*, e a etapa de expressão em *Pichia pastoris* se encontra em andamento. Todos os resultados deste trabalho revelam *C. byssicola* como uma nova fonte de enzimas holocelulolíticas, que ainda precisa ser explorada. **Palavras chave:** *Clonostachys byssicola*, BN-PAGE, secretoma, holocelulasas, pectinases, pectato liases.

Abstract

Saprophytic filamentous fungi represent promising sources of holocellulolytic enzymes, and the cultivation of these organisms in inexpensive inducing carbon sources, such as agricultural residues, would allow the production of enzymatic cocktails at reduced costs. In this work, the potential of a *Clonostachys byssicola* strain for the production of holocellulolytic enzymes is described. The evaluation of the secretome produced by the fungus in submerged culture with several lignocellulosic carbon sources through BN-PAGE electrophoresis revealed the presence of bands of high molecular mass, corresponding to the putative protein complexes. From the identification of these bands by LC-MS / MS, the complexes were found to harbor several enzymes involved in the degradation of holocellulose, such as cellulases, mannanases, xylanases and pectinases. The complexes are also catalytically active, since it was possible to identify *in gel* enzymatic activity. In another step of the work, the secretome of the fungus obtained in commercial (Avicel, carboxymethylcellulose-CMC and oat spelt xylan) and agroindustrial (corn cob, soybean hull, banana and sugarcane bagasse, sugar) carbon sources was characterized by LC-MS / MS. The greatest diversity of proteins was identified in the secretome obtained from Avicel and corn cob, respectively. Several enzymes related to the degradation of lignocellulose were identified, which shows that the fungus is able to produce complete enzymatic systems specific to each of the main holocellulose fractions: cellulose, hemicelluloses and pectin. The secretomes obtained from agroindustrial residues were used to saccharify partially-delignified corn cob and sugarcane bagasse. The crude extracts released more sugars from the hydrolysis of corn cob, revealing a higher digestibility of this substrate when compared to the bagasse, which may be due to the lower lignin content observed after corn cob treatment. The secretomes allowed the solubilization of a large part of the xylan present in the corn cob, with the release of xylobiose as the main hydrolysis product. *C. byssicola* strain was also evaluated for the production of pectinolytic enzymes when grown in medium containing orange peel as the sole carbon source. The fungus was able to secrete pectinases and pectate lyases. The characterization of the secretome by LC-MS / MS revealed a large diversity of enzymes acting on the main chain and side substituents. A partially purified fraction was characterized regarding the effect of temperature and pH, and the pectinase activity was maximal at 50 ° C and in the pH range between 4.5 and 6.0. These characteristics suggest the application of the enzyme for the treatment of fruit juices with low acidity. One of the partially purified enzymes was identified by LC-MS / MS, and from this identification, the corresponding transcript was successfully cloned in *Escherichia coli*, and the expression step in *Pichia pastoris* is underway. All the results of this work reveal *C. byssicola* as a new source of holocellulolytic enzymes, which still needs to be explored. **Keywords:** *Clonostachys byssicola*, BN-PAGE, secretome, holocellulases, pectinases, pectate lyases.

Capítulo 1

*Introdução, objetivo geral e revisão
bibliográfica*

Introdução

Todos os anos, milhões de toneladas de resíduos vegetais são gerados pelo manejo das principais lavouras agrícolas em diversas regiões do planeta. Estes resíduos, quando incorretamente dispostos, são responsáveis por considerável impacto ambiental, além de permitirem a proliferação de pragas agrícolas. Além disso, este material normalmente é descartado através de combustão, o que contribui para o aumento da emissão de gases do efeito estufa. Levantamento feito pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) considerando as principais culturas agrícolas mundiais (milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar), indicou que no ano de 2010, cerca de 250 milhões de toneladas de gases do efeito estufa foram gerados em decorrência da queima de resíduos derivados dessas culturas. Entre os maiores emissores, destacam-se Estados Unidos, China e Brasil (FAO, 2010).

Os resíduos agrícolas correspondem, essencialmente, às fibras vegetais, que apresentam como principal característica estrutura resistente e de complexa digestão. Essa propriedade decorre, principalmente, da estrutura e composição da parede celular vegetal. A parede é composta por polissacarídeos e lignina que, organizados em uma estrutura tridimensional complexa, conferem a rigidez característica das fibras vegetais. Grande parte da energia fixada pelos vegetais no processo fotossintético é destinada à síntese dos componentes da parede celular vegetal e, portanto, os resíduos agrícolas representam uma fonte valiosa de substratos aplicáveis em processos industriais para a obtenção de combustíveis e outras substâncias químicas de interesse. Esse é o principal fundamento de uma biorrefinaria, que utiliza a lignocelulose como matéria-prima para a produção de diversos produtos.

Uma gama diversa de produtos pode ser obtida através de processos industriais que utilizam biomassa lignocelulósica como matéria prima. Estes produtos incluem biocombustíveis, hidrocarbonetos, precursores de polímeros utilizados na fabricação de plásticos, e muitos outros compostos químicos de elevado valor econômico (Sheldon, 2014). A transformação da biomassa lignocelulósica pode ser obtida através de métodos químicos ou biológicos, por meio de processos fermentativos. Nesse último caso, é necessário que a

estrutura da lignocelulose seja desconstruída aos seus monômeros constituintes, que serão utilizados para sustentar o crescimento dos microrganismos fermentativos. As enzimas apresentam-se como alternativas interessantes para a degradação da lignocelulose, uma vez que atuam de forma específica, o que permite obtenção de produtos de degradação em elevado rendimento, sem a formação de outros produtos indesejáveis. Há grande interesse na utilização de biocatalisadores em processos de conversão de biomassa lignocelulósica. Por exemplo, as enzimas utilizadas em processos de produção de biocombustíveis já representam uma porção considerável do mercado global de enzimas (Jaramillo et al., 2015).

Embora já existam vários coquetéis enzimáticos comerciais destinados à sacarificação de biomassa lignocelulósica, a busca por novos catalisadores, bem como métodos de produção mais baratos são importantes, já que a maioria dos processos que utilizam a lignocelulose como matéria-prima ainda não apresentam viabilidade econômica atrativa. Nesse sentido, diversas alternativas têm sido propostas, como a utilização de resíduos agrícolas como fontes baratas para a obtenção de misturas enzimáticas complexas. Ainda, a prospecção de novas enzimas a partir do estudo da biodiversidade microbiana é extremamente importante, não somente para a busca por enzimas mais eficientes, como também para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na degradação dos polímeros que constituem a parede celular vegetal. O Brasil concentra uma parte considerável da biodiversidade mundial, mas os recursos naturais sofrem pressão por parte de ações antrópicas, como a exploração ilegal, e a expansão da fronteira agrícola. O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, mas já perdeu metade de sua cobertura original, e grande parte da área remanescente encontra-se fragmentada (Brasil, 2015) . Dessa forma, a biodiversidade desse bioma precisa ser estudada, de forma a propor alternativas que subsidiem a sua valorização.

Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar o arsenal enzimático produzido por *C. byssicola* por meio de análise proteômica comparativa qualitativa e quantitativa do secretoma cultivado em diferentes fontes de carbono comerciais e resíduos agrícolas.

Objetivos Específicos

- Prospecção e caracterização de complexos multienzimáticos nesses secretomas;
- Aplicação dos secretomas em processos de sacarificação de resíduos agrícolas;
- Produção, purificação parcial e caracterização de pectinases produzidas sob indução por casca de laranja.

Revisão Bibliográfica

Parede Celular

A parede celular consiste em uma matriz complexa, estruturada e rígida que envolve a célula vegetal (Figura 1.1). As funções primárias da parede celular são delimitar forma e tamanho, resistir à pressão de turgor, e tornar a célula vegetal mais resistente às intempéries ambientais e ao ataque de patógenos (Lagaert et al., 2009). Apesar de sua rigidez, a parede celular vegetal é, na verdade, uma estrutura dinâmica. Diversos processos fisiológicos e celulares essenciais à planta decorrem, inicialmente, de mudanças na estrutura e composição da parede celular vegetal, como os processos de diferenciação celular e as cascatas de sinalização. Todos esses eventos, que decorrem principalmente de modificações na parede celular vegetal, foram cruciais para o processo de colonização do ambiente terrestre pelas plantas, permitindo a sua adaptação para um ambiente drasticamente distinto quando comparado ao ambiente aquático (Popper et al., 2011; Sorensen et al., 2010).

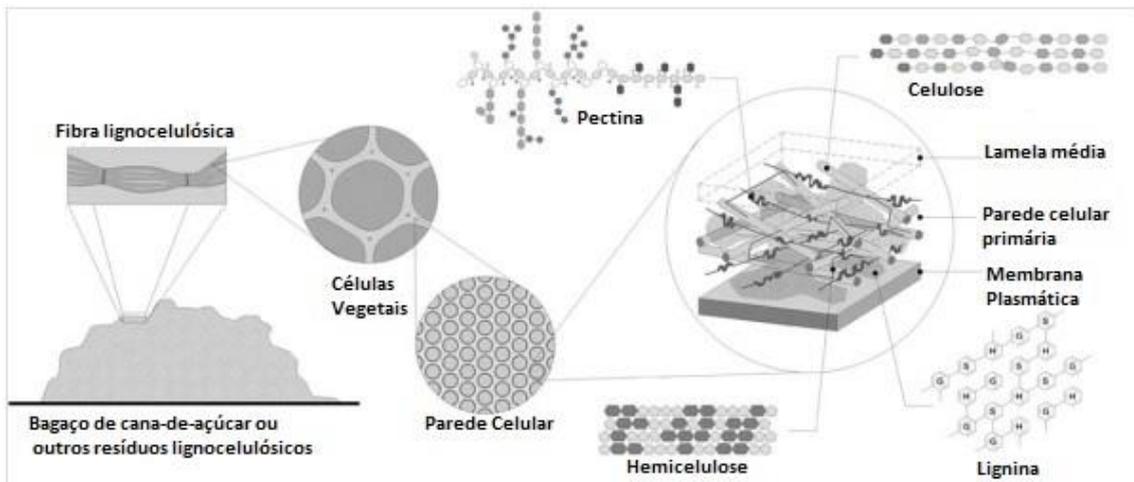


Figura 1.1. Estrutura geral da parede celular vegetal. Extraído e adaptado de (Siqueira and Ferreira Filho, 2010).

Com base na fase de crescimento celular em que são sintetizadas, as paredes celulares vegetais são classificadas em primárias ou secundárias. As paredes primárias são sintetizadas durante a etapa de crescimento da célula. A deposição se inicia após a divisão celular, e uma vez que a célula ainda experimentará uma etapa de crescimento, a parede celular primária deve ser rígida o suficiente para permitir a proteção da célula, mas ao mesmo tempo deve exibir a flexibilidade necessária à expansão das células recém-geradas (Cosgrove and Jarvis, 2012).

A maioria das espécies vegetais apresenta composição similar da parede celular primária: os componentes predominantes são os polissacarídeos, mais especificamente celulose, hemicelulose, composta majoritariamente por xiloglicano, e pectina. Uma exceção importante diz respeito às paredes primárias de gramíneas (ordem Poales), nas quais as hemiceluloses predominantes são arabinoxilana e glicanos de cadeia mista (Cosgrove and Jarvis, 2012).

A resistência que as paredes primárias conferem à célula é resultante da interação entre as cadeias de celulose, xiloglicano e pectina. As pectinas apresentam extensas áreas de interação com os demais polissacarídeos componentes da parede primária, sendo o polímero que interage em maior contato com as cadeias de celulose, cobrindo grande parte de sua superfície. As interações do xiloglicano com a celulose são pontuais, e muito peculiares: o xiloglicanos apresentam-se ligados ao interior das microfibrilas de celulose (Dick-Pérez et al., 2011). Estes pontos de contato entre celulose e xiloglicanos,

denominados de *hotspots* biomecânicos, têm despertado cada vez mais atenção, pois acredita-se que estas estruturas sejam fundamentais para a manutenção da integridade da parede celular, bem como para o controle da extensibilidade da célula vegetal (Park and Cosgrove, 2015).

Ao contrário da parede celular primária, que mantém uma certa flexibilidade para suportar o crescimento celular, a parede celular secundária apresenta uma estrutura mais rígida, e é sintetizada após a fase de expansão da célula. Em termos de composição, a parede celular secundária apresenta fibras de celulose mais resistentes e organizadas, conteúdo bem menor de pectinas e uma substituição de xiloglicanos por outras hemiceluloses, principalmente xilanas e mananas, cuja predominância varia em função do tipo celular, bem como da espécie vegetal (Cosgrove and Jarvis, 2012; Scheller and Ulvskov, 2010).

Talvez a alteração mais significativa, responsável por modificar drasticamente as propriedades da parede celular secundária, seja a deposição de lignina nos espaços entre as frações de celulose e hemicelulose. A lignificação como estratégia de diferenciação celular foi uma aquisição evolutiva crucial para a plena conquista do ambiente terrestre pelas plantas, pois a formação de fibras e vasos condutores lignificados proporcionou sustentação e eficiente captação de água solo. Além disso, o surgimento da via de síntese dos compostos aromáticos precursores da lignina (que precedeu a síntese da lignina propriamente dita) foi extremamente importante para a proteção das primeiras espécies vegetais terrestres contra a radiação ultravioleta (Weng and Chapple, 2010).

A lignificação confere um caráter hidrofóbico à matriz da parede celular, reforçando a rigidez e a resistência mecânica da parede, e dificultando consideravelmente sua degradabilidade (Zhong and Ye, 2015). A deposição de lignina na parede celular pode ocorrer em resposta à alguma agressão ou estímulo ambiental, ou como parte do processo de diferenciação celular. Tecidos vegetais lesionados, ou sob ataque de patógenos, ativam as vias de síntese dos precursores de lignina numa forma de aumentar a resistência da parede celular, reduzir o estado de hidratação da matriz e dificultando a ação de enzimas microbianas. As células que sofrem diferenciação incluem os elementos

traqueais, que são as células que integram o xilema; as células do esclerênquima, que formam as fibras, e estão presentes em diversos tecidos, nos quais contribuem para a sustentação mecânica da planta; as células endodérmicas, presentes nas raízes; e as células presentes na capa protetora da maioria das sementes (Barros et al., 2015).

Celulose: estrutura e biossíntese

A celulose é um homopolímero linear de unidades de glicose, unidas entre si por ligações do tipo β (1 \rightarrow 4). As cadeias de glicose associam-se intimamente entre si, originando uma estrutura estável, pouco reativa, e resistente à degradação, características que tornam a celulose o principal componente responsável pela resistência característica das paredes celulares vegetais. Esta estrutura pouco reativa caracteriza a porção cristalina da celulose. No entanto, a fração cristalina é, por vezes, interrompida por algumas regiões amorfas, onde as cadeias de glicano apresentam-se mais dispersas e desorganizadas (Nishiyama, 2009).

As cadeias de glicose encontram-se associadas através de interações intermoleculares, originando a unidade básica da celulose: a microfibrila (Figura 1.2). Interações de hidrogênio são estabelecidas lateralmente entre cadeias distintas de glicose, originando uma folha. Adicionalmente, as folhas interagem entre si verticalmente, tanto por ligações de hidrogênio, que envolvem resíduos hidroxil de folhas distintas, quanto por forças de van der Waals, estabelecidas a partir dos grupos CH dos anéis piranosídicos dos resíduos de glicose (Parthasarathi et al., 2011). Não há consenso sobre quantas cadeias de glicose compõem a microfibrila de celulose. Ding et al., (2014) estipularam a microfibrila como composta por 36 cadeias de glicose, ao passo que Fernandes et al., (2011) estimaram em 24 cadeias de glicano. Já Newman et al., (2013) e Thomas et al., (2013) relatam que tanto um modelo de microfibrilas com 24 cadeias quanto 18 cadeias são possíveis. Microfibrilas adjacentes podem interagir lateralmente por interações de hidrogênio, dando origem a feixes de celulose.

A disposição espacial dos grupos químicos nos resíduos de glicose permite a distinção de duas faces nas microfibrilas celulósicas (Figura 1.2). Os grupamentos hidroxil encontram-se em uma posição equatorial (lateral) em relação ao plano do anel piranosídico, ao passo que os resíduos CH encontram-

se perpendiculares à esse plano. Dessa forma, as faces da microfibrila de celulose que expõem os anéis piranosídicos correspondem às faces hidrofóbicas, ao passo que as faces nas quais se encontram expostos os radicais hidroxil correspondem às faces hidrofílicas (Park and Cosgrove, 2015). Essa distinção de faces nas microfibrilas de celulose é importante, uma vez que determinam a interação da celulose com os demais componentes da parede vegetal e com enzimas celulolíticas (Liu et al., 2011; Park and Cosgrove, 2015).

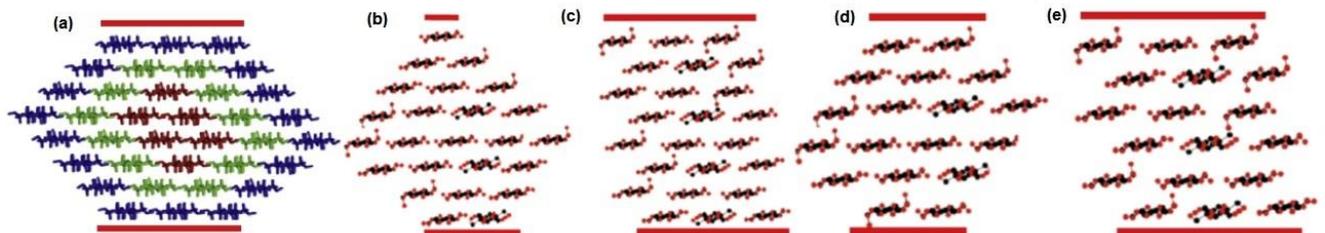


Figura 1.2. Estruturas propostas para a microfibrila de celulose: (a) 36 cadeias de glicano, em formato hexagonal; (b) 24 cadeias de glicano, em formato de diamante; (c) 24 cadeias de glicano, em formato retangular; (d) e (e): duas versões de 18 cadeias de glicano. As linhas vermelhas representam as faces hidrofóbicas, que variam em área de acordo com o modelo proposto. Extraído de Cosgrove, (2014).

A biossíntese das cadeias de celulose ocorre na membrana plasmática da célula vegetal. O processo é catalisado pelo complexo de síntese de celulose, um complexo multiprotéico que apresenta localização transmembrânica, sendo composto por sintases de celulose, bem como outras proteínas acessórias, como glicanases envolvidas na edição das cadeias de glicano, e proteínas regulatórias (Endler and Persson, 2011). Os complexos apresentam um formato característico de roseta, organizado em seis subcomplexos, cada um contendo um trímero de unidades de sintase de celulose (Hill et al., 2014). À medida que a síntese de celulose ocorre, os complexos se deslocam pela membrana plasmática e permitem a deposição de celulose ao longo da superfície celular. A movimentação dos complexos aparentemente é direcionada por componentes do citoesqueleto celular, mas as evidências disponíveis ainda não permitem comprovar como é a participação do citoesqueleto nesse processo (Endler and Persson, 2011).

Os complexos de síntese de celulose utilizam como substrato uridina-difosfato glicose (UDP-glicose), canalizados do citoplasma para o processo de síntese, e os resíduos de glicose adicionados à cadeia apresentam rotação de 180°C em relação aos resíduos vizinhos, razão pela qual a unidade básica de

celulose é a celobiose, e não a glicose (Guerriero et al., 2010). Dez genes que codificam para a síntese de sintases de celulose foram identificados no genoma de *Arabidopsis*: *CesA1-10*, sendo que as enzimas codificadas pelos genes *CesA1*, *CesA2*, *CesA3*, *CesA 5* e *CesA6* são responsáveis pela síntese de celulose na parede celular primária, e as enzimas codificadas pelos genes *CesA4*, *CesA7* e *CesA8* estão envolvidas na síntese de celulose durante a deposição da parede celular secundária. O papel da proteína expressa pelo gene *CesA10* ainda não foi elucidado (Endler and Persson, 2011).

A síntese de celulose impacta diretamente as propriedades do polímero na parede celular vegetal. A celulose na parede primária apresenta uma menor rigidez quando comparada à celulose na parede secundária. E tal diferença é um reflexo da dinâmica dos complexos de sintase de celulose, conforme demonstrado por Li et al., (2016). Estes autores verificaram que, durante a síntese da parede celular primária, os complexos de sintase de celulose apresentam-se mais dispersos e em menor concentração na membrana plasmática. Como resultado, tem-se uma rede de celulose mais dispersa e com menor cristalinidade, condizente com a necessidade de uma maior flexibilidade da parede celular primária, que deve se expandir para acompanhar o crescimento celular. No entanto, os complexos de sintases de celulose apresentam-se em concentrações maiores na membrana celular durante a deposição da parede celular secundária. O resultado é a deposição de material celulósico mais denso, representando uma estrutura muito mais rígida, e necessária para estabilidade e resistência da parede celular secundária.

Hemiceluloses: estrutura e biossíntese

As hemiceluloses representam um grupo diverso de polissacarídeos (Figura 1.3), que apresentam como característica em comum a ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ em configuração equatorial. Nas paredes celulares primárias e secundárias, as hemiceluloses representam a segunda fração mais abundante, e são extremamente importantes para a manutenção da integridade e resistência da parede celular, uma vez que se associam aos demais componentes, formando uma rede complexa e bem articulada de interações intermoleculares (Scheller and Ulvskov, 2010; Zhong and Ye, 2015).

Os xiloglicanos são polímeros cuja cadeia principal é formada por resíduos de glicose unidos por ligações β (1 \rightarrow 4) (Figura 1.3). Ao contrário da cadeia de glicana da celulose, os resíduos glicosil da cadeia principal dos xiloglicanos podem apresentar substituições laterais. As mais frequentes são substituições por resíduos de xilose, associados à cadeia principal a partir de ligações do tipo α (1 \rightarrow 6). Os resíduos de xilose podem ainda apresentar associações à resíduos de arabinose ou galactose, sendo que os resíduos de galactose podem estar ligados a resíduos de fucose (Scheller and Ulvskov, 2010). Cadeias de xiloglicano também podem apresentar acetilações em resíduos de galactose das cadeias laterais, ou em parte dos resíduos de glicose da cadeia principal (Park and Cosgrove, 2015).

As xilanas são um grupo diverso de polissacarídeos cuja cadeia principal é formada por resíduos de xilose (Figura 1.3). Diversos tipos de substituintes laterais podem estar presentes associados à cadeia principal, o que permite a geração de uma gama diversa de xilanas. Resíduos de ácido glicurônico ou ácido 4-O-metilglicurônico se associam à resíduos de xilose da cadeia principal através de ligações do tipo α (1 \rightarrow 2). Cadeias de xilana com predominância destes substituintes laterais são denominadas de glicuronoxilanas. Outra substituição bem frequente consiste na associação de resíduos de arabinose aos resíduos de xilose a partir dos átomos de oxigênio O-2 e/ou O-3. As arabinoxilanas apresentam resíduos de arabinose como principal substituinte lateral, ao passo que as glicuronoarabinoxilanas apresentam tanto resíduos de arabinose quanto de ácido glicurônico associados à cadeia principal. Adicionalmente, resíduos de xilose podem apresentar acetilações, mais frequentemente no oxigênio O-3 (Scheller and Ulvskov, 2010). As xilanas representam o componente hemicelulósico predominante nas paredes celulares secundárias da maioria das espécies vegetais terrestres. No entanto, os tipos de xilana presentes nessas paredes variam consideravelmente entre as espécies. As glicuronoxilanas correspondem à principal hemicelulose presente na madeira de angiospermas (Willför et al., 2005b). Já as paredes celulares vegetais de gramíneas apresentam as glicuronoarabinoxilanas como componentes hemicelulósicos predominantes (Scheller and Ulvskov, 2010).

Os resíduos de arabinose de glicuronoarabinoxilanas presentes nas paredes celulares das gramíneas normalmente se apresentam associados à moléculas de ácidos hidroxicinâmicos, sendo os ácidos ferúlicos e p-cumárico os mais frequentes (Scheller and Ulvskov, 2010). Estes ácidos aromáticos desempenham papel fundamental na manutenção da integridade da parede celular, uma vez que podem ser condensados a partir de reações oxidativas, originando dímeros. Esses dímeros permitem a ligação cruzada entre cadeias distintas de xilana, entre cadeias de xilana e de pectina, e entre a xilana e a lignina (Oliveira et al., 2015). As pontes estabelecidas entre os ácidos hidroxicinâmicos contribuem para a recalcitrância típica das paredes celulares secundárias em gramíneas, uma vez que a frequência dessas ligações, bem a ligação cruzada entre hemicelulose e lignina contribuem para a resistência da biomassa vegetal à sacarificação (Lygin et al., 2011). Outro componente típico das paredes celulares secundárias de gramíneas são os glicanos de cadeia mista (Faik, 2010). Estes polímeros lineares apresentam em sua cadeia principal blocos de três ou quatros unidades de glicose associados por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, e esses blocos estão conectados a partir de ligações $\beta(1\rightarrow3)$ (Scheller and Ulvskov, 2010).

As mananas e glicomananas possuem cadeia principal constituída por resíduos de manose, e resíduos de manose e glicose em padrões não-repetitivos, respectivamente (Figura 1.3). Os resíduos de manose da cadeia principal podem se associar lateralmente a resíduos de galactose, originando as galactomananas e galactoglicomananas (Scheller and Ulvskov, 2010). Galactoglicomananas representam o polissacarídeo predominante da fração hemicelulósica da madeira de gimnospermas (Willför et al., 2005a) . Além disso, as mananas atuam como carboidratos de reserva e barreira para proteção física do embrião em sementes de várias espécies vegetais, destacando-se as espécies de leguminosas (Buckeridge, 2010).

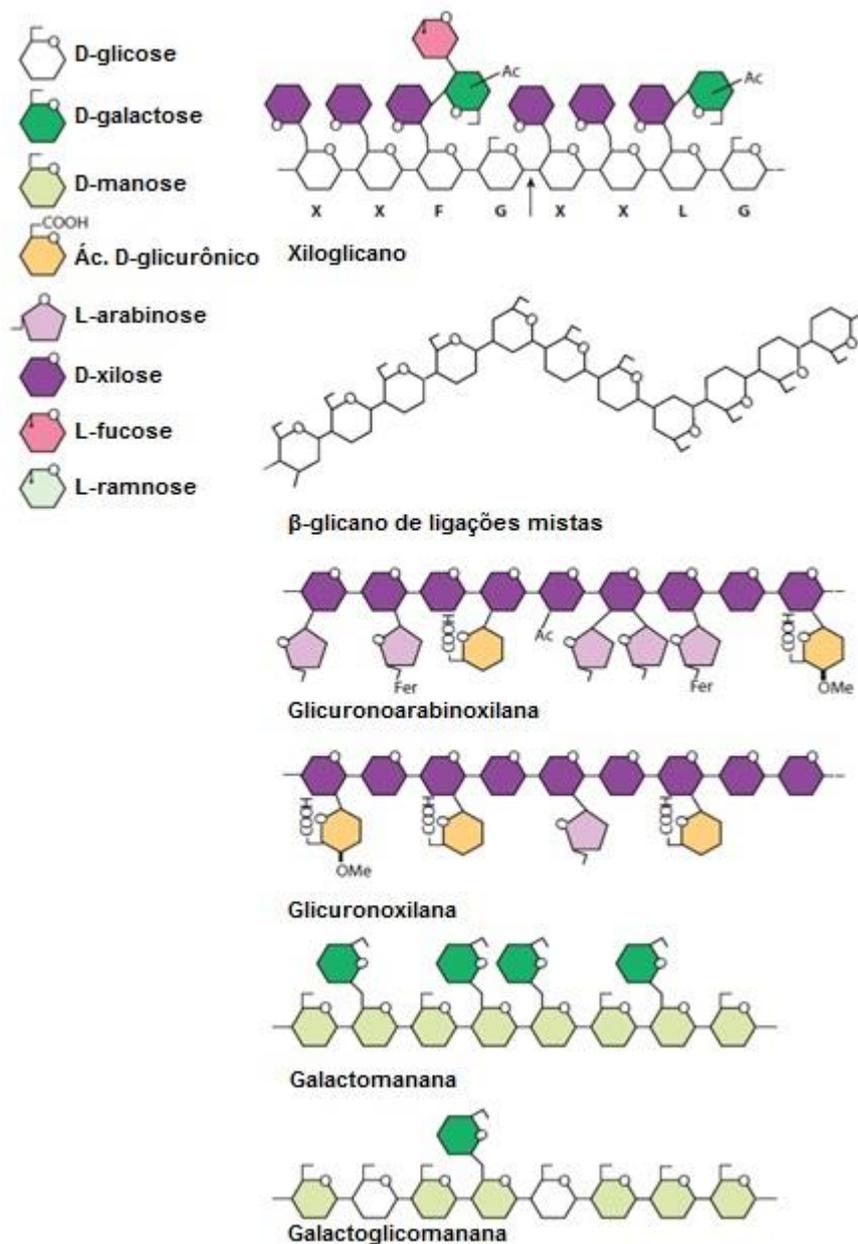


Figura 1.3. Estrutura geral das hemiceluloses. Extraído e adaptado de (Scheller and Ulvskov, 2010).

De um modo geral, as hemiceluloses apresentam uma grande diversidade de substituintes laterais. Essa característica afeta diretamente as propriedades físico-químicas dos componentes hemicelulósicos, e por consequência as interações estabelecidas com os demais polímeros que integram a complexa estrutura da parede celular. O grau de substituições presentes em cadeias de xiloglicano determina a sua estrutura tridimensional, e consequentemente a capacidade de interação destes polissacarídeos com a celulose (Park and Cosgrove, 2015). De forma similar, Busse-Wicher et al., (2014) relataram que o

nível de substituição lateral de cadeias de xilana (em particular acetilações) é determinante sobre o modo de interação dessas cadeias com a celulose. A interação celulose-xilana é de extrema importância, uma vez que as xilanas atuam como barreiras que impedem as microfibrilas de celulose de coalescerem. As substituições laterais também podem regular a solubilidade dos polissacarídeos na parede celular. Mananas lineares apresentam pouca solubilidade, e constituem uma estrutura para-cristalina, ao passo que a presença de resíduos de galactose como substituintes laterais elevam consideravelmente a solubilidade desses polissacarídeos (Rodríguez-Gacio et al., 2012).

Ao contrário da síntese de celulose, o processo de produção das hemiceluloses é intracelular, sendo que a montagem das cadeias do polissacarídeo é efetuada no lúmen do complexo de Golgi, a partir de precursores ativados sintetizados tanto no interior da organela quanto no citoplasma. Diversas transferases estão localizadas na membrana do complexo de Golgi, e muitas das enzimas estão associadas em grandes complexos multienzimáticos, de forma que a síntese das hemiceluloses caracteriza-se por um processo cooperativo envolvendo diferentes tipos de enzimas (Faik, 2010; Rennie and Scheller, 2014). A síntese da cadeia principal das mananas, dos xiloglicanos e dos glicanos de cadeias mistas é efetuada por enzimas que apresentam similaridade às sintases de celulose. Já a síntese das xilanas é efetuada por transferases distintas, não relacionadas às sintases de celulose. A adição dos substituintes laterais fica a cargo de transferases específicas para cada tipo de substituinte. Após a síntese, as cadeias de hemicelulose são transportadas à membrana plasmática através de vesículas, e durante esta fase os polissacarídeos passam por um processo de maturação, ou seja, sofrem modificações pós-síntese em sua estrutura a partir da ação de hidrolases (Pauly et al., 2013).

Pectina: estrutura e biossíntese

A pectina é um polissacarídeo presente principalmente nas lamelas médias e paredes celulares primárias, onde desempenha diversas funções estruturais e fisiológicas. As lamelas médias são sintetizadas imediatamente após a conclusão do processo de divisão celular, e são responsáveis pela

manutenção da adesão entre células adjacentes. A lamela média é rica em pectina, e esse polissacarídeo atua como agente cimentante responsável pela aderência estabelecida entre células distintas. Adicionalmente, produtos resultantes da degradação da pectina atuam como importantes sinalizadores celulares em processos de agressão (como herbivoria ou ataque de patógenos), permitindo o desenvolvimento da resposta imune apropriada (Daher and Braybrook, 2015). Conforme mencionado anteriormente, as pectinas desempenham importante papel na manutenção da integridade da estrutura da parede celular primária, a partir de interações estabelecidas com a celulose e o xiloglicano (Dick-Pérez et al., 2011).

A pectina é um importante componente estrutural dos tecidos que constituem os frutos de muitas espécies vegetais. Durante o processo de amadurecimento, alterações imprimidas à estrutura da pectina por hidrolases e esterases específicas são determinantes para o desenvolvimento da textura característica dos frutos. A degradação enzimática da pectina ocasiona a perda da adesão entre as células, bem como permitem uma maior hidratação do tecido vegetal, culminando com a redução da resistência mecânica e com o desenvolvimento da suculência típica da maioria das frutas de importância econômica (Brummell, 2006; Brummell and Harpster, 2001; Paniagua et al., 2014).

A pectina constitui um polissacarídeo complexo cuja principal característica é a presença de ácido galacturônico, em sua estrutura. A complexidade estrutural da pectina permite a identificação de três domínios principais, distintos em sua estrutura: homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II (Figura 1.4). Esses três domínios apresentam-se ligados covalentemente, determinando uma única estrutura para a pectina (Atmodjo et al., 2013).

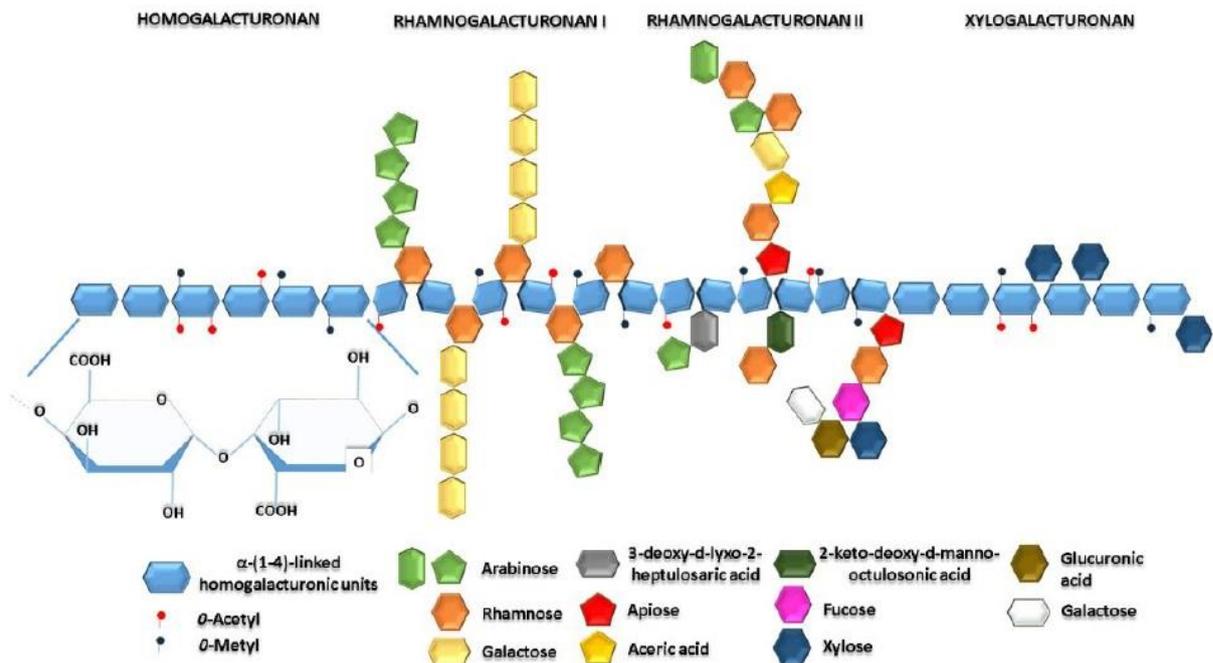


Figura 1.4. Estrutura da pectina, mostrando os principais domínios do polissacarídeo. Extraído de Albuquerque et al., (2016).

A homogalacturonana é o domínio predominante, representando cerca de 65% da pectina (Atmodjo et al., 2013). É constituída por uma cadeia principal composta de resíduos de ácido galacturônico associados a partir de ligações do tipo α (1→4). Os resíduos carboxil das unidades de ácido galacturônico podem estar esterificados com radicais metil, e estas substituições alteram consideravelmente as propriedades da pectina, como carga e solubilidade. Adicionalmente, os resíduos galacturonil podem apresentar O-acetilações nos carbonos C-2 ou C-3 (Ridley et al., 2001). Os radicais de ácido carboxílico não-esterificados apresentam a capacidade de interação com íons de cálcio. Cadeias diferentes de homogalacturonana podem se associar a partir de pontes intermediadas por íons de cálcio, num modelo conhecido como “caixa de ovos” (Figura 1.5a), conferindo à pectina a propriedade de formar géis (Caffall and Mohnen, 2009).

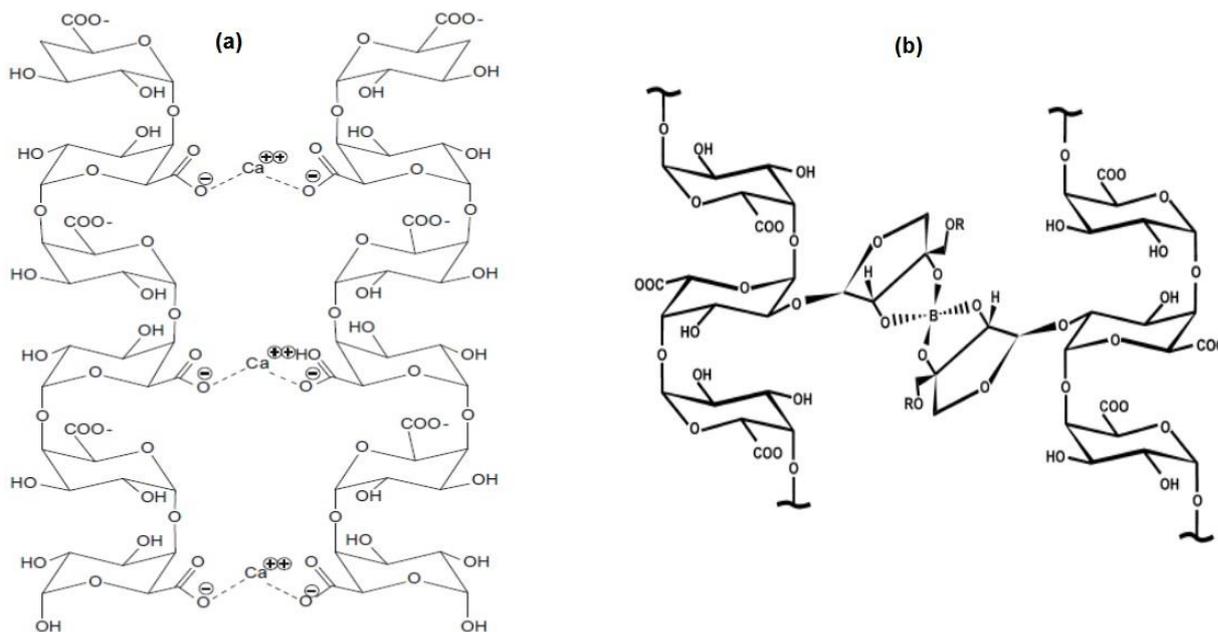


Figura 1.5. Modelos de interação iônica presentes na pectina. (a) Interação entre cadeias de homogalacturonana mediada por íons de cálcio, segundo o modelo “caixa de ovos” (extraído de Caffall and Mohnen, (2009). (b) Interação entre cadeias de ramnogalacturonana II mediada por íons borato (extraído de Ridley et al., (2001).

A ramnogalacturonana I é o segundo domínio predominante, representando de 20 a 35% da pectina. Apresenta a cadeia principal constituída por um dissacarídeo de ramnose e ácido galacturônico, sendo que estes dois resíduos apresentam-se associados por ligações alternadas α (1 \rightarrow 2) e α (1 \rightarrow 4) ([\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]. As substituições presentes nos resíduos de ácido galacturônico são as mesmas observadas na homogalacturonana, ao passo que os resíduos de ramnose normalmente apresentam-se associados, pelo carbono C4, a resíduos arabinofuranosil e galactopiranosil através de ligações do tipo α (1 \rightarrow 5) e β (1 \rightarrow 4), respectivamente. Os resíduos de arabinose e galactose podem se apresentar em unidades ou cadeias (Caffall and Mohnen, 2009; Ridley et al., 2001).

A ramnogalacturonana II corresponde a uma homogalacturonana substituída. É a fração minoritária, representando cerca de 10% da pectina (Atmodjo et al., 2013). Quatro tipos de substituintes laterais podem se associar à cadeia de ácido galacturônico. Ao carbono C-2 podem se associar uma cadeia de 9 (cadeia A) ou 8 (cadeia B) resíduos de açúcar, sendo muitos desses açúcares incomuns, como apiose, ácido acérico, ácido 2-ceto-3-deoxi-D-lixo heptulosárico (Dha) e ácido 2-ceto-3-deóxi-D-mano octulosônico (Kdo). As

cadeias C e D são dissacarídeos e se associam ao carbono C-3 dos resíduos galacturonil (Caffall and Mohnen, 2009). Da mesma forma que a homogalacturonana, a ramnogalacturonana II apresenta a capacidade de formar géis, mas por um mecanismo diferente: resíduos laterais de apiose interagem com átomos de Boro, permitindo a associação de cadeias distintas de ramnogalacturonana II (Figura 1.5b) (Ridley et al., 2001).

Os processos de síntese da pectina e das hemiceluloses guardam algumas semelhanças. A montagem dos domínios que compõem a pectina também ocorre no complexo de Golgi, catalisada por transferases organizadas em complexos enzimáticos associados à membrana da organela. As cadeias de pectina também são transportadas à membrana através de vesículas, e também sofrem processamento pós-síntese ao longo do transporte, através da ação de hidrolases e esterases (Anderson, 2016). Curiosamente, a maioria dos açúcares presentes na pectina são originados em uma complexa via de interconversão a partir de apenas dois precursores ativados: UDP-glicose e GDP-manose (Atmodjo et al., 2013).

Lignina: estrutura e biossíntese

A lignina é um polímero complexo, de estrutura tridimensional, formado unidades fenólicas (monolignóis) derivadas de três principais álcoois hidroxicinâmicos: *p*-coumaril, coniferil e sinapil. Estes três compostos, quando condensados na estrutura da lignina, originam as unidades de *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G), e siringil (S) (Boerjan et al., 2003; Zhong and Ye, 2015). A composição da lignina varia entre as espécies vegetais: a lignina das angiospermas é composta principalmente por unidades G e S, exceto a lignina das monocotiledôneas (gramíneas), que apresenta uma proporção uniforme dos três monômeros. Já a lignina de gimnospermas apresenta predomínio de unidades G, menor quantidade de unidades H, e praticamente ausência de unidades S (Bonawitz and Chapple, 2010). Além das três unidades fenólicas predominantes, outros monômeros podem estar presentes na estrutura da lignina de algumas espécies, como ferulatos, coniferaldeídos e *p*-coumaratos (Bonawitz and Chapple, 2010).

A síntese dos monolignóis precursores ocorre na interface entre o citoplasma e a superfície externa do retículo endoplasmático (Barros et al.,

2015). Os monolignóis são sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina, através da via biossintética dos fenilpropanóides (Figura 1.6), e posteriormente são direcionados à membrana plasmática (Miedes et al., 2014). O mecanismo de transporte dos monolignóis ainda não está elucidado, e pode envolver o carreamento através de vesículas, ou a participação de transportadores específicos localizados na membrana. Ao alcançarem a superfície celular, os monolignóis precursores sofrem oxidação a partir da ação de lacases e peroxidases localizadas na membrana, e se tornam radicais ativados que se polimerizam de forma combinatória, ou seja, não há orientação quanto à polimerização dos precursores, de modo que a composição do agregado nascente de lignina é determinada apenas pela disponibilidade de radicais ativados (Barros et al., 2015; Bonawitz and Chapple, 2010; Zhong and Ye, 2015).

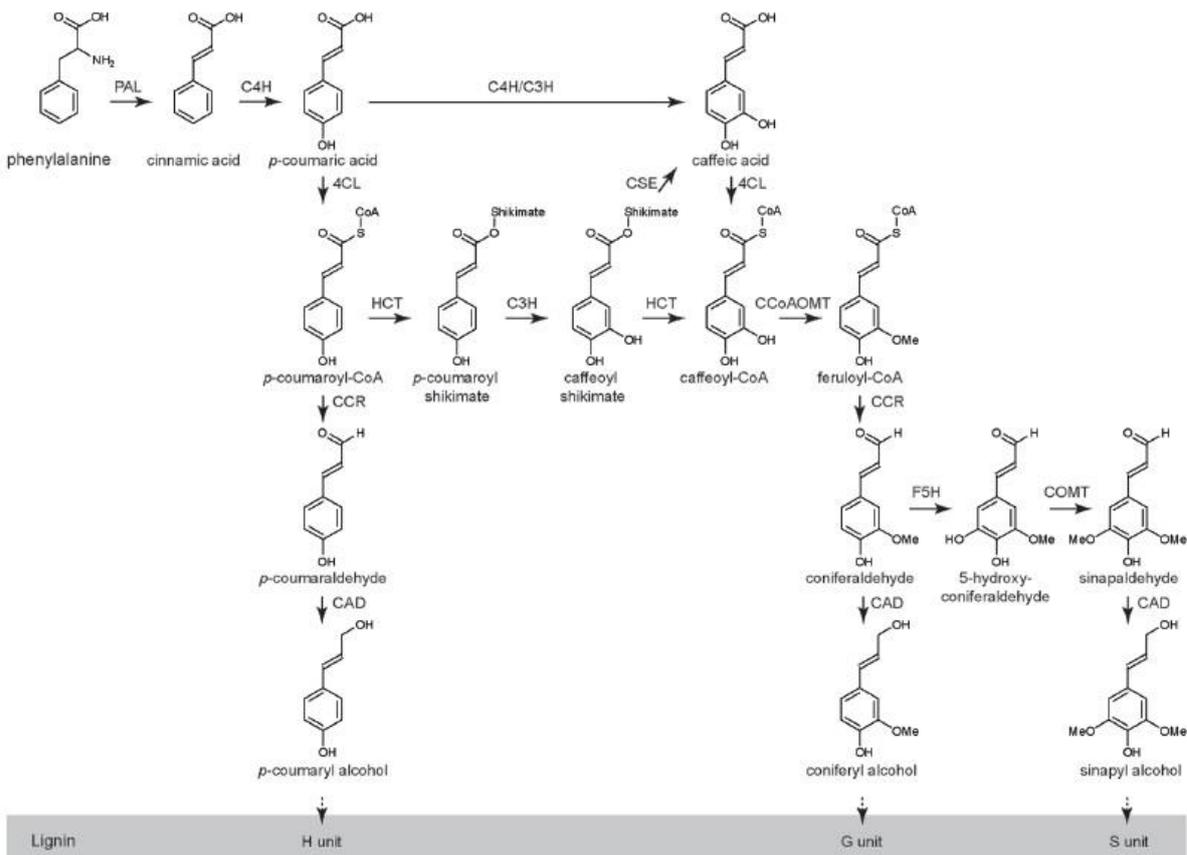


Figura 1.6. Via de síntese dos monômeros constituintes da lignina. Extraído de Miedes et al., (2014).

Parede celular vegetal, recalcitrância e pré-tratamento

Considerando as funções desempenhadas pela parede celular, que incluem sustentação mecânica às células e tecidos vegetais, bem como proteção contra o ataque de patógenos e herbívoros, é fácil concluir que a o arcabouço da matriz que constitui a parede celular é configurado de forma a constituir uma estrutura rígida, e resistente à degradação. Essa propriedade da parede celular – denominada recalcitrância - constitui o principal obstáculo para o pleno uso da lignocelulose como matéria-prima renovável em processos industriais (Pauly and Keegstra, 2008). A recalcitrância da parede celular vegetal é determinada, principalmente, pela estrutura cristalina da celulose; pela interação entre os polímeros constituintes da parede; e pela deposição de lignina.

Conforme mencionado anteriormente, a estrutura básica da celulose é a microfibrila, que consiste de um conjunto de cadeias de glicano que se associam por interações intermoleculares: ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Mesmo que essa associação seja dominada por interações consideradas fracas, a organização das cadeias de glicano resulta em uma estrutura extremamente compacta, estável e pouco reativa. Além disso, as moléculas de água encontram-se organizadas na superfície das microfibrilas de celulose, o que dificulta a difusão de substância e, por consequência, reduz drasticamente a reatividade de toda a estrutura (Gross and Chu, 2010). Resultados experimentais demonstram que a redução da cristalinidade da estrutura celulósica, alcançada a partir do emprego de reagentes químicos que induzem a desorganização das cadeias de glicano (como o ácido fosfórico) permite uma maior hidratação e aumentam a reatividade e a susceptibilidade à degradação enzimática (Hall et al., 2010).

As hemiceluloses formam uma complexa rede na parede celular. Cadeias hemicelulósicas estão associadas à superfície da celulose, contribuindo para a estabilização da estrutura das microfibrilas, e também ocupam os espaços interfibrilares, formando barreiras importantes que reduzem a acessibilidade de enzimas à fração celulósica da parede celular (Meng and Ragauskas, 2014; Silveira et al., 2013). A remoção da hemicelulose está associada ao aumento da digestibilidade enzimática da parede celular vegetal, uma vez que permite a maior exposição das microfibrilas de celulose (Yang et al., 2015). A presença da

hemicelulose nos espaços interfibrilares também determina a porosidade do material lignocelulósico. Os poros de acesso às cadeias de celulose determinados em função da presença da fração hemicelulósica são pequenos o suficiente para impossibilitar a penetração de celulasas ao interior da matriz da parede celular, ao passo que a remoção da hemicelulose aumenta consideravelmente o diâmetro desses poros (Adani et al., 2011).

A deposição da lignina aumenta o caráter hidrofóbico da parede celular vegetal, e a redução do estado de hidratação também diminui a reatividade da matriz lignocelulósica. Além do caráter amorfo conferido à lignocelulose, a lignina também afeta negativamente a ação das enzimas responsáveis pela degradação da holocelulose (fração correspondente aos polissacarídeos da lignocelulose) através de adsorções irreversíveis. Essas ligações – ditas não-produtivas – ocorrem em decorrência de interações hidrofóbicas estabelecidas entre os resíduos apolares das proteínas e os compostos fenólicos presentes na lignina, impedindo tanto a degradação enzimática quanto a recuperação das enzimas, o que compromete a viabilidade de todo o processo (Rahikainen et al., 2013). Adicionalmente, a presença de compostos fenólicos livres, derivados ou não da lignina, atuam como inibidores da atividade de diversas enzimas que atuam sobre os constituintes da parede celular vegetal (Duarte et al., 2012).

Em função da recalcitrância característica da parede celular vegetal, os resíduos lignocelulósicos devem ser submetidos a etapas de pré-tratamento antes de serem utilizados como matérias-primas em processos industriais. Os objetivos principais do pré-tratamento são o de remover ou fracionar os componentes da lignocelulose (em especial a lignina), bem como reduzir a cristalinidade da estrutura da celulose. Dessa forma, a biomassa vegetal se torna mais susceptível à hidrólise, seja ácida ou enzimática (Behera et al., 2014). O pré-tratamento deve permitir a maior recuperação possível de todos os componentes lignocelulósicos, de preferência em frações separadas, com a menor demanda de energia, e evitando ao máximo a formação de compostos inibitórios do crescimento microbiano, derivados tanto da lignina (compostos fenólicos) quanto da degradação de açúcares (furfurais e aldeídos) (Agbor et al., 2011). Diversas estratégias de pré-tratamento têm sido desenvolvidas, e a escolha da melhor estratégia é determinada em função do tipo de material

lignocelulósico a ser tratado, bem como da fração da lignocelulose que se pretende alterar ou recuperar. Os pré-tratamentos envolvem a utilização de princípios físicos (mecânicos), físico-químicos, químicos, bem como a combinação destes.

O pré-tratamento mecânico visa a redução do tamanho médio das partículas que compõem o material lignocelulósico. Normalmente, o resíduo lignocelulósico é submetido a algum processo de trituração, corte ou moagem. A redução do tamanho das partículas favorece a degradabilidade do material, uma vez que aumenta a superfície de exposição dos componentes lignocelulósicos. Além disso, a redução do tamanho de partícula é acompanhada, em alguns casos, da redução da cristalinidade da celulose, e dessa forma o pré-tratamento mecânico também permite a melhor degradação deste polímero (Silva et al., 2012). Apesar de todas as vantagens citadas, o pré-tratamento mecânico demanda uma considerável quantidade de energia, de forma que a correta escolha e configuração deste tipo de pré-tratamento é fundamental para a garantia da viabilidade econômica da utilização dos resíduos lignocelulósicos em processos industriais (Vidal Jr. et al., 2011).

O pré-tratamento físico-químico utiliza a combinação de elevadas temperaturas e a presença de água para promover o aumento da degradabilidade da biomassa vegetal. As condições de elevada temperatura e pressão empregadas nos pré-tratamentos físico-químicos favorecem a formação de ácidos orgânicos a partir da decomposição de alguns substituintes laterais da hemicelulose, como resíduos acetil e glucuronil. Esses ácidos orgânicos atuam na decomposição e solubilização da fração hemicelulósica, através do rompimento de ligações glicosídicas (Alvira et al., 2010). Os pré-tratamentos físico-químicos mais utilizados são a explosão a vapor, e o tratamento hidrotérmico (*Liquid Hot Water*). Na explosão a vapor, a biomassa vegetal é saturada com vapor de água em elevadas temperaturas, e após o tempo de exposição adequado, o sistema de tratamento é rapidamente despressurizado. Durante a explosão a vapor, parte da hemicelulose é solubilizada pelos mecanismos de hidrólise ácida já mencionados anteriormente, aumentando a digestibilidade da lignocelulose por favorecer a exposição da fração celulósica (Mosier et al., 2005; Ramos, 2003). O tratamento hidrotérmico funciona segundo

os mesmos princípios da explosão a vapor, mas nesse pré-tratamento, a água é mantida em estado líquido a partir do aumento de pressão. O uso de água no estado líquido favorece a solubilização de uma maior fração da hemicelulose quando se compara o tratamento hidrotérmico à explosão a vapor (Hendriks and Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005). A partir do pré-tratamento hidrotérmico, obtém-se um licor enriquecido com oligômeros derivados da hemicelulose e da porção amorfa da celulose, e um sólido remanescente composto por celulose e lignina (Silva and Ferreira Filho, 2017).

Os processos de pré-tratamento químico diferem consideravelmente quanto aos efeitos sobre os constituintes da parede celular vegetal. O pré-tratamento ácido atua principalmente na solubilização da hemicelulose, aumentando a degradabilidade da biomassa vegetal por permitir a maior exposição da fração celulósica (Alvira et al., 2010). Neste tipo de pré-tratamento, podem ser utilizados ácidos diluídos ou concentrados. Apesar de permitir a hidrólise dos polissacarídeos da parede celular, o uso de ácidos gera uma gama de problemas, incluindo a necessidade de alcalinização do hidrolisado antes da fermentação; a geração de resíduos poluentes, e a corrosão de equipamentos (Mosier et al., 2005).

Outra estratégia de pré-tratamento químico consiste no uso de substâncias alcalinas, como o hidróxido de sódio, amônia, e hidróxido de cálcio. Estes tratamentos têm sido bastante utilizados, principalmente para resíduos lignocelulósicos derivados de espécies herbáceas e gramíneas, especialmente em função da alta especificidade para a remoção da lignina, ao mesmo tempo em que preservam grande parte da fração holocelulósica. Durante o pré-tratamento alcalino ocorre a dissolução da lignina e de parte da hemicelulose. Ainda, as ligações éster são quebradas, possibilitando o rompimento de interações intermoleculares estabelecidas entre os componentes da parede celular (como as pontes diferúlicas que mantêm associadas as frações de hemicelulose e lignina), a remoção de substituintes laterais da hemicelulose (como resíduos acetil e feruloil/coumaroil), além de permitir a redução no grau de polimerização da lignina (Kim et al., 2016). Além da delignificação, alguns pré-tratamentos alcalinos (que utilizam hidróxido de sódio ou amônia líquida, por exemplo) também promovem alterações na estrutura da celulose, permitindo a

redução na cristalinidade de sua estrutura e favorecendo sua degradabilidade enzimática. O provável mecanismo para essa alteração estrutural promovida na celulose pelos compostos básicos está relacionado à interferência na rede de ligações de hidrogênio, que são fundamentais para a manutenção da estrutura cristalina da celulose (Mittal et al., 2011).

Degradação enzimática da holocelulose: características gerais

A degradação da estrutura polissacarídica da parede celular (holocelulose) pode ser realizada a partir de hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida apresenta alguns inconvenientes, como a corrosão de equipamentos e instrumentos, a geração de subprodutos poluentes, e a formação de compostos inibitórios aos crescimento de microrganismos fermentadores (Brodeur et al., 2011). Dessa forma, as enzimas apresentam-se como ferramentas promissoras para a degradação da holocelulose, pois apresentam ação específica e em condições físico-químicas mais amenas, o que permite a obtenção de açúcares monoméricos em alto rendimento.

Um grupo diverso de enzimas atua na degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal. A complexidade química e estrutural da holocelulose requer a ação coordenada de enzimas que atuam no rompimento das ligações glicosídicas catalisando reações de hidrólise, desesterificação e β -eliminação. Por atuarem sobre substratos insolúveis, algumas dessas enzimas apresentam-se constituídas por dois módulos principais: um módulo catalítico, envolvido na degradação das ligações químicas, e um módulo de ligação a carboidrato (CBM, do inglês *Carbohydrate-binding Module*). As principais funções dos CBMs são concentrar e direcionar as enzimas sobre a superfície de seu substrato, além de promover alterações estruturais que contribuem para a desorganização da cadeia de carboidrato, contribuindo para a degradação (Arantes and Saddler, 2010; Hervé et al., 2010). O módulo catalítico e o CBM são unidos por um conector flexível, que normalmente é glicosilado e também apresenta importância para a ligação dos dois módulos ao polissacarídeo (Payne et al., 2013).

Apesar da grande diversidade de glicosil-hidrolases existentes na natureza, essas enzimas compartilham um mecanismo de reação muito semelhante. A degradação da ligação glicosídica promovida por essas enzimas

consiste em uma catálise do tipo ácido/base, onde os resíduos catalíticos envolvidos são o ácido glutâmico e/ou o ácido aspártico. Estes resíduos e suas formas ionizadas atuam como ácidos e bases responsáveis pelo ataque às moléculas de água e pela clivagem da ligação glicosídica. A catálise pode gerar produtos de degradação com a posição da hidroxila do carbono anomérico (C1) invertida ou mantida (retida) em relação à posição original (Figura 1.7). Algumas enzimas degradam a ligação glicosídica a partir de um mecanismo de deslocamento simples, que ocorre em uma única etapa, e a hidroxila associada ao carbono anomérico dos produtos resultantes apresenta posição invertida em relação à posição inicial (mecanismo de inversão). Entretanto, outras enzimas empregam o mecanismo de duplo deslocamento: nessa reação, há inicialmente o rompimento da ligação glicosídica, mas com a retenção de um dos monômeros ligado covalentemente ao resíduo catalítico da hidrolase. Posteriormente, uma molécula de água é utilizada para promover a remoção deste açúcar da estrutura da enzima, e a hidroxila do carbono anomérico deste açúcar liberado permanece na mesma posição original (mecanismo de retenção) (Ardèvol and Rovira, 2015; Withers, 2001).

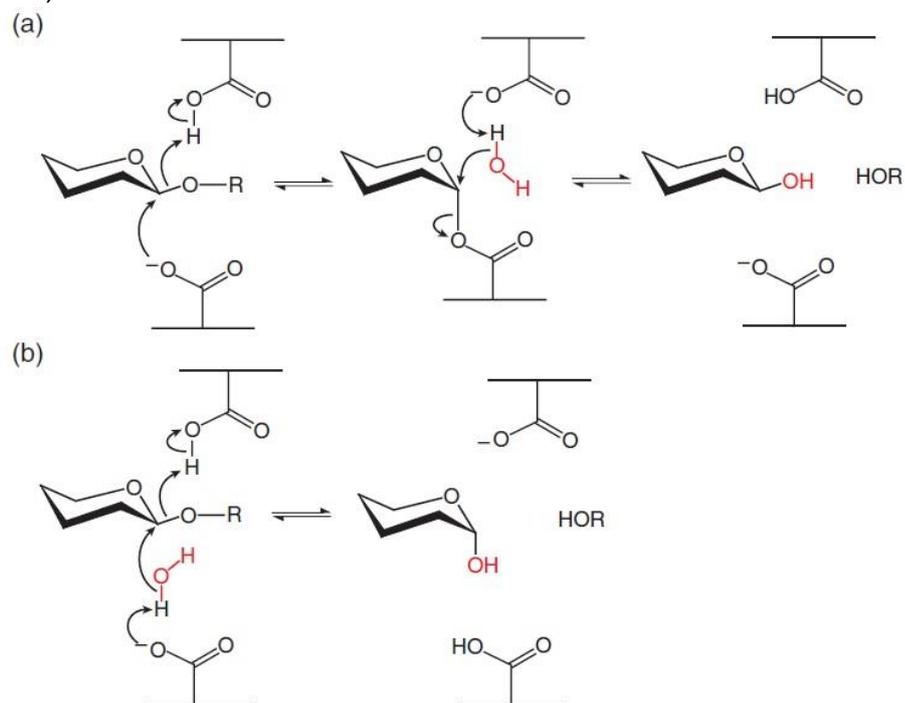


Figura 1.7. Mecanismos gerais de reação empregados pelas glicosil-hidrolases: retenção (a) ou inversão (b) da posição da hidroxila do carbono anomérico. Extraído de Dodd and Cann, (2009).

As holocelulases estão classificadas, de acordo com a sequência de aminoácidos, em uma base de dados que integra todas as enzimas que atuam na síntese, degradação e modificação de carboidratos: o CAZy (do inglês *Carbohydrate-active Enzymes*). A classificação com base na sequência de aminoácidos apresenta uma melhor correlação com a estrutura molecular e os mecanismos de reação das carbohidrases, em comparação às classificações convencionais que consideravam como critério a especificidade de substratos. Além disso, a partir dos dados disponíveis no CAZy é possível estabelecer relações evolutivas, bem como classificar proteínas que ainda não apresentam função conhecida (Cantarel et al., 2009).

As enzimas registradas no CAZy são classificadas em famílias, de acordo com a natureza da atividade enzimática: glicosil hidrolases (GH), que compreende as enzimas que degradam as ligações glicosídicas através de hidrólise e as enzimas que promovem transglicosilações; glicosil transferases (GT), onde se encontram classificadas as enzimas envolvidas na síntese de ligações glicosídicas; polissacarídeo liases (PL), relacionada às enzimas que clivam ligações glicosídicas por meio de reações de β -eliminação; carboidrato esterases (CE), que inclui as enzimas que degradam ligações éster envolvendo carboidratos; e a família que inclui os módulos de ligação a carboidrato (CBM). Essas famílias ainda podem ser subdivididas, em função de especificidade de substratos (Cantarel et al., 2009; Lombard et al., 2014).

Até o ano de 2013, o CAZy possuía cerca de 340 mil proteínas registradas, sendo a maioria delas (cerca de 160 mil) classificadas em famílias de GH (Lombard et al., 2014). Recentemente, um novo grupo de famílias foi criada no CAZy. A família de atividades auxiliares (AA) compreende as enzimas que atuam na degradação de polissacarídeos por reações oxidativas, bem como as enzimas relacionadas à degradação de lignina. Essas últimas enzimas, apesar de não atuarem na degradação de carboidratos, foram incluídas no CAZy porque a lignina se encontra associada à holocelulose na parede celular vegetal, e também em função de evidências de que moléculas derivadas da lignina podem participar da reação catalisada pelas oxidases de carboidratos (Levasseur et al., 2013; Monclaro and Filho, 2017).

A atuação cooperativa das holocelulases é fundamental para a completa e eficiente degradação da fração holocelulósica da parede celular. Designa-se sinergismo o fenômeno observado quando a quantidade de produtos de degradação liberada pela ação conjunta de duas ou mais enzimas é superior à soma das quantidades dos mesmos produtos resultante da ação individual dessas enzimas. O homosinergismo caracteriza-se pela atuação cooperativa de enzimas que compartilham a preferência pela mesma porção de uma cadeia polissacarídica. Dessa forma, o homosinergismo é verificado quando da atuação conjunta de duas ou mais enzimas que atuam na degradação da cadeia principal, ou entre duas ou mais enzimas que atuam na degradação de substituintes laterais. O heterosinergismo, ao contrário, é observado entre enzimas que atuam na cadeia principal e enzimas que atuam sobre os substituintes laterais. Além dessas interações cooperativas, a ação de uma determinada enzima pode modificar o substrato de forma a dificultar a ação de outras enzimas. Essa situação caracteriza o anti-sinergismo (Coughlan et al., 1993). Adicionalmente, a ação de duas ou mais enzimas pode ser antagonista nos casos em que diferentes catalisadores disputam pelo mesmo sítio de ligação ao substrato (Malgas et al., 2015).

Celulases

A degradação da estrutura da celulose é efetuada por um conjunto de enzimas que atuam na quebra de ligações glicosídicas tanto por hidrólise quanto

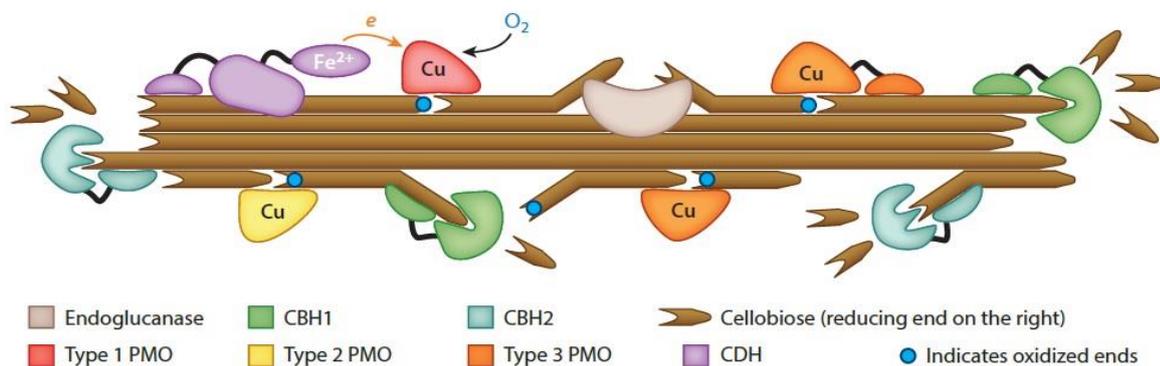


Figura 1.8. Elenco de enzimas hidrolíticas e oxidativas responsáveis pela degradação da celulose. Legenda: PMO: monooxigenase de polissacarídeos. CBH: celobiohidrolase. CDH: celobiose-desidrogenase. Extraído de Beeson et al., (2015).

por oxidação (Figura 1.8). A atuação coordenada dessas enzimas é crucial para a desconstrução de um polímero tão recalcitrante como a celulose.

Um grupo de três enzimas atua na hidrólise das ligações glicosídicas das cadeias de celulose. As endoglicanases (E.C 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis pela degradação das cadeias de glicano a partir das regiões amorfas, localizadas ao longo da estrutura da celulose. A atuação dessas enzimas resulta na liberação de celooligômeros de diversos graus de condensação. Já as exoglicanases (E.C 3.2.1.74) atuam nas extremidades das cadeias de glicano, e uma vez que essas enzimas normalmente exibem uma catálise processiva (a enzima promove quebras sucessivas e sequenciais no substrato). Nesse caso, os principais produtos liberados são celobiose ou glicose. As celobiohidrolases podem ser classificadas em I e II, quando atuam sobre a extremidade redutora e não-redutora da cadeia de glicano, respectivamente. Por fim, as beta-glicosidases atuam sobre os celooligômeros liberados pelas endo- e exoglicanases, convertendo-os em glicose (Horn et al., 2012; Lynd et al., 2002).

A reações oxidativas empregadas para a degradação das ligações glicosídicas na estrutura da celulose são catalisadas por dois grupos de enzimas. As celobiose desidrogenases são enzimas formadas por dois domínios principais: um domínio contendo flavina, e outro domínio contendo um grupamento heme. Estes dois domínios são associados por um conector flexível. As celobiose desidrogenases atuam sobre unidades de celobiose presentes nas cadeias de glicano da celulose, onde catalisam a oxidação do carbono C1 a partir da subunidade contendo flavina. Em decorrência dessa oxidação, forma-se ácido celobiônico. Os elétrons obtidos na reação são transferidos ao domínio que contém o grupamento heme, e esses elétrons serão utilizados na redução de outros compostos (Tan et al., 2015; Zamocky et al., 2006). Com base em critérios filogenéticos, as celobiose desidrogenases podem ser agrupadas em três classes principais: as do grupo I, que são encontradas em basidiomicetos, e as do grupo II e III, produzidas por ascomicetos. Ainda, celobiose desidrogenases pertencentes ao grupo II podem apresentar em sua estrutura módulos de ligação a carboidratos (Harreither et al., 2011).

As oxidases líticas de polissacarídeos (LPMOs, de *Lytic Polysaccharide MonoOxygenases*) representam um conjunto de enzimas descobertas recentemente. Anteriormente, essas enzimas eram classificadas como celulasas hidrolíticas na família GH 61. As LPMOs apresentam estrutura bem característica, e distinta das hidrolases convencionais. O sítio ativo dessas enzimas apresenta a forma de uma superfície plana, contendo um domínio que permite a associação à íons de Cobre. Além disso, nesse sítio ativo encontram-se vários aminoácidos aromáticos dispostos de forma a interagir com os anéis piranosídicos de moléculas de glicose presentes na superfície das cadeias de celulose. Dessa forma, conclui-se que essas enzimas apresentam preferência de ligação às regiões mais cristalinas e recalcitrantes da celulose. A descoberta das LPMOs representou um avanço importante nas estratégias de degradação enzimática da celulose, uma vez que a atuação dessas enzimas sobre a estrutura mais recalcitrante da celulose poderia acelerar a degradação de toda a estrutura, reduzindo a carga de enzima necessária (Beeson et al., 2015; Horn et al., 2012; Monclaro and Filho, 2017).

O mecanismo de reação das LPMOs é complexo. Essas enzimas necessitam de oxigênio molecular, além de uma fonte de elétrons externa para promoverem a oxidação da ligação glicosídica. Normalmente a doação de elétrons fica a cargo das celobiose-desidrogenases, mas outros compostos, como derivados de lignina, podem desempenhar essa função (Phillips et al., 2011; Westereng et al., 2016). A oxidação pode ocorrer nos carbonos C1 ou C4, dependendo da especificidade da enzima, e os produtos formados são, respectivamente, o ácido aldônico e a 4-cetoaldose. As LPMOs são classificadas em tipo I, quando oxidam C1; tipo II, quando oxidam C4; e tipo III, quando oxidam ambos os átomos de carbono. A reação envolve, basicamente, a abstração de um átomo de hidrogênio do carbono C1 ou C4, seguida de uma hidroxilação. A adição do radical hidroxil é responsável por instabilizar a ligação glicosídica, levando ao seu rompimento (Beeson et al., 2015, 2012; Frandsen et al., 2016).

As LPMOs parecem exercer um efeito mais profundo sobre toda a estrutura da celulose, que não se restringe apenas à oxidação das cadeias de glicano na superfície nas microfibrilas. Recentemente, Villares et al., (2017) reportaram que a ação dessas oxidases cobre-dependentes favoreceu a

desintegração das microfibrilas de celulose. Estes resultados reforçam a importância das LPMOs como componentes fundamentais para a degradação da lignocelulose, não apenas por promoverem a geração de novos pontos de ataque à celulose cristalina para as enzimas hidrolíticas, mas também por proporcionarem mudanças mecânicas consideráveis sobre a estrutura da microfibrila celulósica, favorecendo a sua degradação.

A ação de todas as enzimas responsáveis pela degradação da celulose é dita sinérgica, ou seja, a transformação do substrato por uma enzima gera pontos favoráveis para a atuação de outras enzimas. Essa cooperação é fundamental para a completa degradação da estrutura recalcitrante da celulose. Observa-se ação sinérgica entre endo- e exo-glucanases, onde a atuação das primeiras gera novas extremidades disponíveis para as segundas e entre as endo- e exo-glucanases e as beta-glicosidades, uma vez que estas enzimas atuam na remoção dos celooligômeros que inibem as glicanases. Além disso, a ação das LPMOs cria pontos para a ação das glucanases, além de promover alterações mecânicas importantes para a redução da cristalinidade da estrutura celulósica. Por fim, as celobiose-desidrogenases atuam em cooperação com as LPMOs como doadores de elétrons (Kostylev and Wilson, 2012; Lynd et al., 2002; Phillips et al., 2011).

Hemicelulases

Conforme mencionado anteriormente, as hemiceluloses correspondem a um grupo complexo de polissacarídeos, que apresentam grande diversidade de tipos de açúcar, ligações glicosídicas, e substituintes laterais. Sendo assim, não é difícil imaginar que a degradação completa e eficiente desse conjunto de polissacarídeos requer a ação coordenada de diversos grupos de enzimas.

A degradação da xilana ocorre a partir da ação coordenada de hidrolases e esterases (Figura 1.9). Endo- e exo-xilanases atuam na hidrólise da cadeia principal de xilose, promovendo a degradação das ligações glicosídicas na porção interna da cadeia e a partir de suas extremidades, respectivamente. Os xilooligômeros liberados por essas enzimas são degradados por β -xilosidases, resultando na liberação de xilose (Dodd and Cann, 2009; Juturu and Wu, 2014). Além das xilanases, outras enzimas atuam na remoção dos substituintes laterais presentes na xilana. A ação dessas enzimas é fundamental, pois esses

substituintes laterais representam barreiras estéricas que impedem a atuação de algumas xilanases sobre a cadeia principal. Os resíduos de acetil são removidos

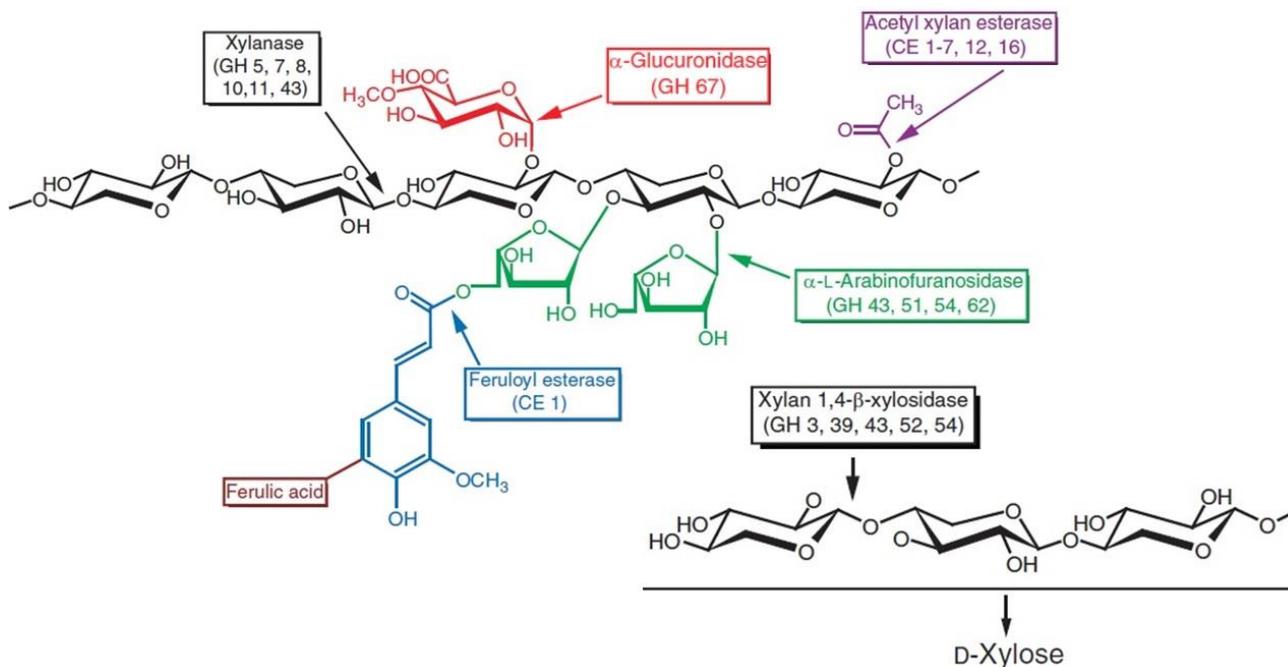


Figura 1.9. Enzimas envolvidas na degradação da xilana. O nome das enzimas está acompanhado das respectivas famílias do CAZy. Extraído de Dodd and Cann, (2009).

pela ação de acetil-xilana esterases. Já as unidades de ácido glicurônico e arabinose são hidrolisadas por α -glicuronidases e α -arabinofuranosidases, respectivamente (Juturu and Wu, 2013). Por fim, feruloil- e p -coumaroil-esterases atuam na degradação das ligações éster entre os resíduos de arabinose e os respectivos ácidos hidroxicinâmicos. A ação dessas esterases é de extrema importância para a degradação da lignocelulose, pois a lignina se encontra associada à hemicelulose a partir de pontes compostas por resíduos de ácido ferúlico e/ou ácido p -coumárico. A atuação dessas enzimas promove o rompimento dessas pontes, permitindo a separação entre hemicelulose e lignina, diminuindo a recalcitrância do material lignocelulósico (Várnai et al., 2014).

De forma similar, a degradação da manana também envolve a participação de enzimas hidrolíticas e esterases. A hidrólise da cadeia principal fica a cargo das endo-mananases (E.C 3.2.1.78), que liberam manooligômeros que são substratos para as β -manosidases (E.C 3.2.1.25) e beta-glicosidases (E.C 3.2.1.21) (Moreira and Filho, 2008). Estas duas hidrolases atuam a partir da extremidade não-redutora dos oligômeros, liberando manose e glicose, respectivamente. Os resíduos laterais são removidos pela ação de α -

galactosidades e acetil-manana esterases. A ação dessas duas últimas enzimas também é importante para a eficiente degradação da cadeia principal, uma vez que as endomananases que atuam nessa região estão sujeitas à impedimento estérico pelos resíduos acetil e galactosil (Chauhan et al., 2012; Malgas et al., 2015; van Zyl et al., 2010).

Pectinases

A degradação da pectina envolve grupos de enzimas específicos para cada domínio do polissacarídeo. A degradação da cadeia principal das homogalacturonanas fica a cargo de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases, que atuam na porção interna, e a partir das extremidades da cadeia, respectivamente. Quando os resíduos de ácido galacturônico apresentam-se esterificados em sua maioria, a degradação fica a cargo de endopolimetilgalacturonases e exopolimetilgalacturonases. Uma vez que os resíduos metil impedem a associação de algumas enzimas à cadeia principal, uma interação sinérgica pode ser observada entre essas enzimas e pectina-metilesterases. (Kashyap et al., 2001). Além das hidrolases, outras enzimas que degradam a ligação glicosídica através de reações de β -eliminação também atuam sobre a cadeia de ácido poligalacturônico. A degradação catalisada por essas enzimas não envolve a adição de água, e como produtos são gerados ácido galacturônico, e um galacturonídeo contendo uma insaturação entre os carbonos C4 e C5. Seguindo a mesma lógica da nomenclatura das hidrolases, também atuam na despolimerização da homogalacturonana as endo- e exopoligalacturonato liases, e endo- e exopolimetilgalacturonato liases (Jayani et al., 2005).

A degradação da cadeia principal da ramnogalacturona I envolve uma maior especialização enzimática. Ramnogalacturonana hidrolases são responsáveis pela degradação das ligações do tipo α (1 \rightarrow 2), ao passo que as ramnogalacturonana liases catalisam o rompimento das ligações do tipo α (1 \rightarrow 4). Ambas são enzimas que atuam na porção interna da cadeia principal, e geram oligômeros de diversos graus de condensação. Estes oligômeros são substratos para outras enzimas: hidrolase de ramnogalacturonil insaturado, responsável pela remoção de resíduos terminais de ácido galacturônico insaturado (gerado pela ação das liases); ramnogalacturonana-ramnohidrolase,

que atua na remoção de resíduos de ramnose a partir da extremidade não-redutora dos oligossacarídeos; e ramnogalaturonana-galacturonohidrolase, que catalisa a liberação de resíduos de ácido galacturônico a partir da extremidade não-redutora dos oligossacarídeos (Wong, 2008). Outras enzimas atuam na remoção de substituintes laterais, como ramnogalaturonana acetilesterases, α -arabinofuranosidasases, β -galactosidasases, endo- e exo-arabinanases e β -endogalactanases (van den Brink and de Vries, 2011).

O mecanismo de reação de algumas pectato liases tem sido estudado (Charnock et al., 2002; Ma et al., 2016; Seyedarabi et al., 2010). A correta orientação e estabilização da cadeia de ácido poligalacturônico no sítio catalítico das liases requer o estabelecimento de uma rede de interações intermoleculares entre o substrato, resíduos de aminoácido carregados, e íons de cálcio (Ca^{2+}). A etapa crucial da reação consiste na abstração de um próton (H^+) a partir do carbono C5 do resíduo de ácido galacturônico (Figura 1.10). Essa desprotonação é executada pelo resíduo catalítico, normalmente uma arginina, e resulta na formação de um intermediário iônico, cuja estrutura é instável e favorável à ruptura da ligação α (1 \rightarrow 4). Outros resíduos, como asparagina ou lisina, contribuem para estabilizar e orientar corretamente os resíduos de ácido galacturônico no sítio catalítico. Com o rompimento da ligação O-glicosídica a partir do carbono C4, tem-se a formação de um galacturonídeo contendo uma insaturação entre C4 e C5, e um resíduo de ácido galacturônico que apresenta um átomo de oxigênio desprotonado ligado ao C1. Esse açúcar é extremamente instável, mas é estabilizado ao receber um próton a partir de moléculas de água presentes na vizinhança do sítio de reação. Essa protonação é favorecida pela presença dos íons Ca^{2+} .

Pela elucidação do mecanismo de reação das pectato liases, é possível reconhecer a importância de aminoácidos carregados para a correta degradação da ligação glicosídica. O resíduo catalítico de arginina deve estar desprotonado, caso contrário não será possível que a etapa de abstração de um próton de C5 ocorra. Além disso, resíduos que interagem e orientam corretamente os íons Ca^{2+} , como aspartatos, também devem apresentar-se ionizados. Estas características ajudam a explicar o motivo pelo qual as liases apresentam ação

em valores de pH elevados, e praticamente não são ativas em condições ácidas (Ali et al., 2015).

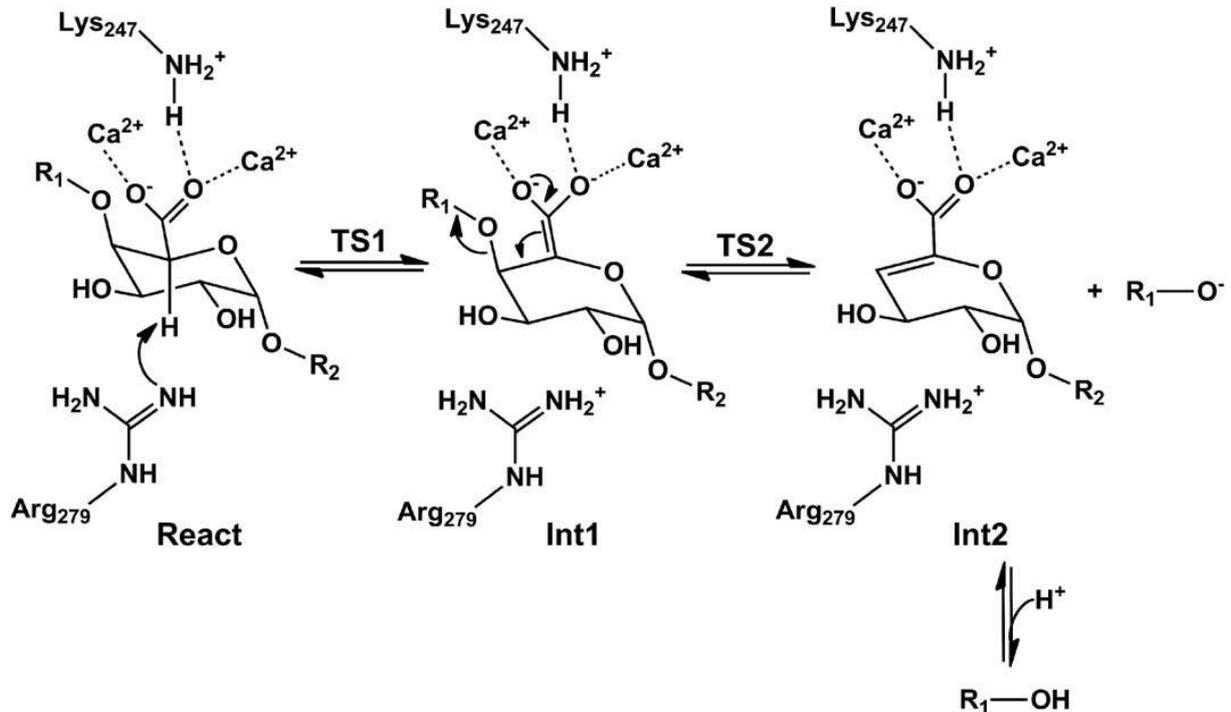


Figura 1.10. Mecanismo de reação proposto para uma pectato liase de *Bacillus subtilis*. Extraído de Ma et al., (2016).

O mecanismo de reação de uma ramnogalacturonana liase produzida por *Aspergillus aculeatus* foi elucidado por Jensen et al. (2010). De forma similar ao mecanismo descrito para as pectato liases, as ramnogalacturonana liases também promovem a abstração de um próton do carbono C5 de um resíduo de ácido galacturônico, o que desestabiliza a cadeia de ramnogalacturonana e favorece o rompimento da ligação glicosídica. Entretanto, a ramnogalacturonana liase de *A. aculeatus* não necessita de íons Ca^{2+} para a estabilização do substrato: resíduos de aspartato e arginina formam uma rede de ligações de hidrogênio com moléculas de água e com os resíduos carboxil de unidades de ácido galacturônico. Os resíduos catalíticos também diferem entre as duas enzimas: na ramnogalacturonana liase um resíduo de lisina atua como base na abstração do próton, e um resíduo de histidina atua como ácido, doando um próton para a estabilização do produto após o rompimento da ligação glicosídica. Ainda, as ramnogalacturonana liases atuam em pH mais baixo (6,5) em relação

às pectato liases (8-10), pois o pK da lisina é reduzido de 9.2 para 6.5 em função do microambiente no sítio catalítico e da ligação ao substrato. Dessa forma, o resíduo catalítico de lisina apresenta-se desprotonado em um valor de pH mais baixo.

Holocelulases fúngicas

Os fungos filamentosos são importantes agentes de degradação do material lignocelulósico na natureza. Estes organismos apresentam a capacidade de se adaptar a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, e por consequência, conseguem colonizar diferentes nichos ecológicos, como o solo e matéria orgânica em decomposição. Dessa forma, os fungos são agentes importantes na reciclagem de compostos de carbono e nitrogênio (Bouws et al., 2008). Além disso, os fungos apresentam uma notável capacidade de secreção de metabólitos e proteínas, uma característica atrativa que permitiu o uso intensivo desses microrganismos nos processos industriais de produção de biomoléculas. As espécies mais utilizadas para essa finalidade pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (Gudynaite-savitch and White, 2016).

No que diz respeito à produção de enzimas celulolíticas, a espécie de maior destaque é *T. reesei*. O primeiro exemplar dessa espécie foi isolado nas Ilhas Salomão, durante a Segunda Guerra Mundial, pelo exército americano. Seu potencial como produtor de celulasas foi rapidamente identificado, e diversos programas de melhoramento da produção dessas enzimas foram iniciados. Em um desses programas foi possível obter o isolado RUT-C30, após procedimentos de mutação por métodos físicos e químicos. Esse isolado se mostrou capaz de produzir níveis de celulase que poderiam chegar a 15-20 vezes o nível produzido pela cepa selvagem, além de mostrar repressão catabólica bem reduzida, o que viabilizou a linhagem RUT-C30 como uma das mais importantes para a produção industrial de celulasas (Peterson and Nevalainen, 2012). Embora o isolado RUT-C30 produza um coquetel celulolítico de alta eficiência e em grandes concentrações, o estudo de outras espécies fúngicas se faz necessário, principalmente com o intuito de caracterizar novos catalisadores que seriam úteis para a complementação dos coquetéis comerciais, com a geração de novos sistemas enzimáticos ainda mais eficientes na degradação da complexa rede de polissacarídeos da parede celular (King et al., 2011).

O conjunto de holocelulases secretado por fungos filamentosos tem despertado grande interesse, principalmente com o objetivo de se alcançar uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos na degradação da biomassa lignocelulósica. O custo dos coquetéis enzimáticos representa um dos principais gargalos no desenvolvimento de processos industriais de transformação da lignocelulose, e a compreensão dos mecanismos envolvidos na eficiente degradação deste material podem contribuir para o desenvolvimento de coquetéis mais eficientes e economicamente viáveis (King et al., 2011). Designa-se secretoma o conjunto de proteínas produzidas por um organismo e destinadas à secreção ou associação à parede celular (Bouws et al., 2008). A caracterização de secretomas foi impulsionada com o desenvolvimento das técnicas de espectrometria de massas. As abordagens tradicionais utilizadas para a caracterização de enzimas em cultivados microbianos envolvem o uso de métodos colorimétricos, que apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade. Ao permitir a caracterização de uma amostra complexa de proteínas, a espectrometria de massas fornece um panorama mais realista da composição e função dos secretomas e constitui uma ferramenta essencial, junto à outras tecnologias como genômica e transcriptômica, para a elucidação dos mecanismos de degradação da biomassa lignocelulósica empregada pelos microrganismos saprófitas e fitopatogênicos (Adav and Sze, 2013).

A utilização de resíduos agroindustriais, como substratos para o cultivo de fungos filamentosos com vistas à obtenção de secretomas com potencial biotecnológico, tem se mostrado uma alternativa promissora. A lignocelulose presente nos resíduos agroindustriais corresponde à um excelente indutor para a produção de holocelulases, uma vez que a sua complexidade estrutural permite a secreção de um sistema enzimático diverso (Siqueira et al., 2010; Siqueira and Ferreira Filho, 2010). Além disso, os resíduos lignocelulósicos apresentam, em sua composição, vários nutrientes minerais essenciais que permitiriam sustentar o crescimento fúngico sem a necessidade de suplementação do meio de cultura. Além de apresentarem baixo custo, as fontes de carbono provenientes de resíduos agroindustriais poderiam ser utilizadas para a produção de enzimas nas mesmas instalações industriais onde ocorreriam os processos de conversão da biomassa vegetal, contribuindo para

uma redução ainda maior dos custos dos coquetéis enzimáticos, uma vez que os gastos relacionados ao transporte e à clarificação dos extratos enzimáticos seriam reduzidos consideravelmente (Ellilä et al., 2017; Silva and Ferreira Filho, 2017).

O sistema holocelulolítico produzidos por fungos filamentosos é comumente caracterizado como composto por enzimas livres, que atuam sinergicamente na degradação do substrato lignocelulósico. Entretanto, diversos trabalhos recentes tem relatado a presença de enzimas holocelulolíticas organizadas em complexos multienzimáticos presentes no secretoma de diversas espécies fúngicas, tais como *Penicillium purpurogenum* (Gonzalez-Vogel et al., 2011), *Trichoderma harzianum* (Silva et al., 2012) e *T. reesei* (Silva et al., 2015). Uma das principais vantagens na associação de diferentes enzimas em estruturas complexas consiste no favorecimento da ação sinérgica resultante da proximidade estrutural entre enzimas que exibem ação cooperativa (Zhang, 2011). Nessa organização, a proximidade estrutura entre as enzimas permite a transferência do produto do sítio ativo de uma enzima para outro catalisador que utilizará este produto como substrato, favorecendo a velocidade da reação. Este fenômeno é denominado de canalização do substrato. Além disso, as enzimas complexadas podem exibir maior resistência à inibição por certos compostos químicos, como íons (Ohtsuki et al., 2005).

Clonostachys

As espécies do gênero *Clonostachys* apresentam como teleomorfos correspondentes as espécies do gênero *Bionectria*, e se encontram classificados na ordem Hipocreales e família Bionectriaceae. Essas espécies são caracterizadas como saprófitas e liquenícolas. Frequentemente as espécies são encontradas em amostras de solo, e também em matéria orgânica vegetal recém-decaída, que ainda não foi colonizada por outras espécies de fungos. Ainda, espécies de *Clonostachys* apresentam comportamento de micoparasitismo frente à outras espécies fúngicas (Schroers, 2001).

A espécie mais estudada do gênero é *Clonostachys rosea* (Teleomorfo: *Bionectria byssicola*). A classificação da espécie foi constantemente alterada desde o século passado, e essas alterações merecem ser mencionadas, uma vez que registros em banco de dados podem conter identificações que não são

mais apropriadas. Os gêneros *Clonostachys* e *Gliocladium* foram propostos por A.C.I Corda em 1839 e 1840, respectivamente (Schroers et al., 1999). Cada um desses gêneros possuía, inicialmente, uma única espécie: *C. araucaria* e *G. penicillioides*. Posteriormente, uma outra espécie foi descrita: *G. roseum*. Pinkerton, (1936) descreveu *C. araucária* e *G. roseum* como sinônimos. A forma teleomórfica de *G. roseum* foi posteriormente descrita como *Nectria ochroleuca*, mas como o gênero *Nectria* apresentava-se como um grupo heterogêneo essa espécie, e todos os teleomorfos de *Gliocladium*, foram transferidos para um novo gênero, *Bionectria* (Schroers, 2001; Schroers and Samuels, 1997). A espécie *G. roseum* diferia consideravelmente das demais espécies desse mesmo gênero. Com base em análises moleculares, Schroers et al., (1999) propuseram a transferência de *G. roseum* para um novo gênero, *Clonostachys*, e desde então essa classificação tem sido mantida.

As características morfológicas de *Clonostachys* sp. são complexas, e por vezes não permitem a correta identificação das espécies. Uma característica que define as formas anamórficas são os conidióforos, que normalmente se apresentam agregados, formando estruturas denominadas esporodóquios. Os conidióforos podem apresentar dimorfismos, sendo classificados como primários (verticilóides) ou secundários (peniciliados), em referência à cronologia de formação dessas estruturas. Os conídios apresentam forma ligeiramente curvada, com lados achatados (Figura 1.11). A principal característica que identifica as espécies de *Bionectria* é a organização dos conídios nos conidióforos secundários, que se apresentam em forma de cadeias ou colunas. Ao contrário do que é observado em espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, os conídios nessas colunas não se apresentam conectados, mas apenas aderidos lateralmente (Schroers, 2001). Curiosamente, as culturas de *C. cylindrospora* obtidas a partir da inoculação com conidióforos primários ou secundários apresentam variações metabólicas e morfológicas, refletindo a importância do estágio em que os conídios são produzidos sobre o metabolismo e crescimento (Hosoya et al., 1995).

As espécies de *Bionectria* apresentam peritécios de coloração com vários tons alaranjados. Essa pigmentação é consideravelmente variável em função da idade da colônia. Os ascósporos são normalmente divididos em duas células por

um septo transversal. As colônias, quando crescidas em meios de cultura como o ágar batata dextrose, apresentam-se com coloração que varia de amarelo a laranja, em diversas tonalidades (Figura 1.11). As colônias podem apresentar aspecto granuloso, resultante da aglomeração de conídios (Schroers et al., 1999).

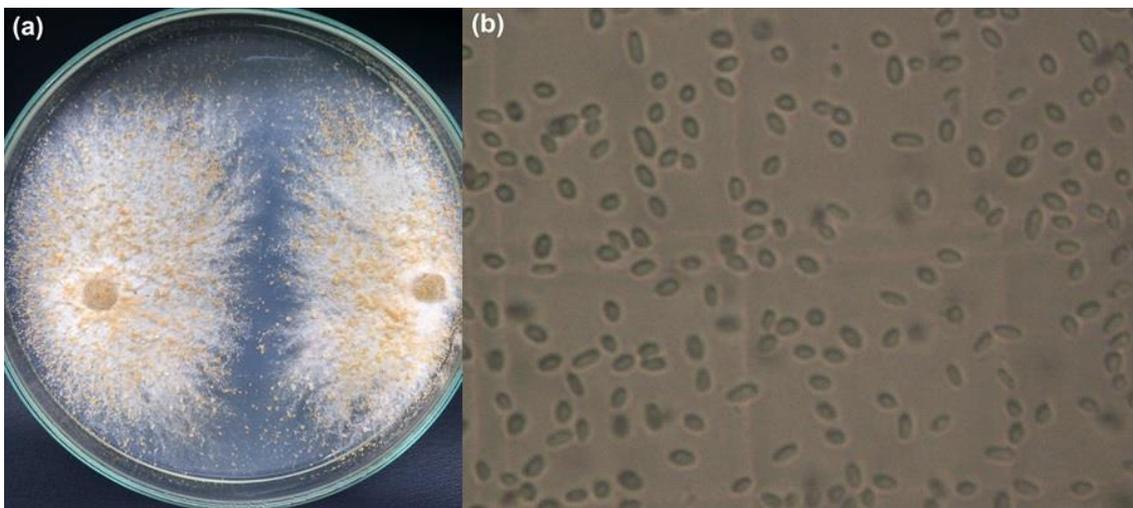


Figura 1.11. (a) Colônia de *Clonostachys byssicola* em ágar batata dextrose (BDA), incubada a 28°C durante 15 dias, e com fotoperíodo de 12 horas. (b) Conidiósporos de *C. byssicola* (aumento de 800x).

Algumas espécies de *Clonostachys* apresentam grande potencial como agentes de controle biológico, em função do hábito micoparasita típico dessas espécies. *C. rosea* tem sido reportado como eficiente agente do controle da germinação de esporos e proliferação de espécies patogênicas do gênero *Botrytis* (Cota et al., 2009; Yohalem et al., 2004). As estratégias utilizadas por *C. rosea* na interação com fitopatógenos têm sido estudadas. Diversas alterações metabólicas são observadas quando agentes de biocontrole são confrontados com fitopatógenos, as quais incluem a biossíntese de compostos com atividade antifúngica, bem como a expressão de genes relacionados à proteção do agente de biocontrole frente à toxinas produzidas pelo patógeno (Daguerre et al., 2014; Rodriguez et al., 2011). Enzimas destinadas à degradação da parede celular de hifas dos fungos patogênicos, como quitinases e β -1,3-glicanases também foram relatadas (Chatterton and Punja, 2009). Além disso, outra estratégia utilizada por agentes de controle biológico de plantas consiste na competição por colonização de substratos (Luongo et al., 2005; Sarrocco et al., 2009).

Diversos produtos comerciais a base de espécies fúngicas micoparasitas estão disponíveis no mercado, sendo alguns deles comercializados no Brasil. As

espécies mais exploradas comercialmente para a promoção do controle biológico pertencem ao gênero *Trichoderma*. Algumas formulações à base de *C. rosea* também são comercializadas, principalmente visando o controle de doenças causadas por espécies do gênero *Botrytis* (Bettiol et al., 2012).

Além de *C. rosea*, outras espécies têm sido avaliadas quanto ao seu potencial como agentes de biocontrole, como é o caso de *C. byssicola*. Esta espécie apresenta ampla distribuição, tendo sido identificada em amostras de solo e serapilheira do Cerrado e da Amazônia (Moreira et al., 2016); associada a superfície de frutas (Al-Najada and Gherbawy, 2015; Alvindia and Hirooka, 2011); e como endofítico de plantas de café (Sette et al., 2006). *C. byssicola* apresentou capacidade de supressão *in vitro* do fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*, atuando através de parasitismo direto (Alvindia and Natsuaki, 2008). A habilidade de parasitismo de *C. byssicola* sobre o fitopatógeno *Phytophthora palmivora* também foi reportada (Krauss et al., 2013).

Apesar das espécies de *Clonostachys* serem amplamente estudadas como agentes de biocontrole, o potencial das espécies desse gênero como fontes de enzimas holocelulolíticas ainda é pouco avaliado. Recentemente, Sciuto et al., (2017) caracterizaram endoglicanases semi-purificadas a partir de extratos brutos de *C. byssicola* crescidos em casca do grão da soja. As enzimas apresentaram considerável termoestabilidade na faixa de 40-50°C, bem como resistência ao efeito inibitório normalmente exercido por compostos fenólicos, revelando o potencial para aplicações na degradação da lignocelulose. O genoma de *C. rosea* foi sequenciado recentemente, e revelou a presença de um complexo conjunto de genes relacionados à expressão de holocelulases de importância biotecnológica. Destaca-se que o genoma de *C. rosea* possui uma quantidade consideravelmente maior de genes codificadores de pectato liases e LPMOs (AA9), quando comparado à outros genomas de Hipocreales, inclusive das espécies de *Trichoderma* (Karlsson et al., 2015). Embora apresente potencial de biocontrole descrito, *C. byssicola* ainda não teve seu genoma sequenciado.

Referências

Adani, F., Papa, G., Schievano, A., Cardinale, G., D'Imporzano, G., Tambone,

- F., 2011. Nano-scale structure of the cell wall protects cellulose from enzyme attack. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1107–1113.
- Adav, S.S., Sze, S.K., 2013. Fungal secretome for biorefinery: Recent advances in proteomic technology. *Mass Spectrom. Lett.* 4, 1–9. doi:10.5478/MSL.2013.4.1.1
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675–85. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.005
- Al-Najada, A.R., Gherbawy, Y.A., 2015. Molecular Identification of Spoilage Fungi Isolated from Fruit and Vegetables and Their Control with Chitosan. *Food Biotechnol.* 29, 166–184. doi:10.1080/08905436.2015.1027222
- Albuquerque, P.B.S., Coelho, L.C.B.B., Teixeira, J.A., Carneiro-Da-Cunha, M.G., 2016. Approaches in biotechnological applications of natural polymers. *AIMS Mol. Sci.* 3, 386–425. doi:10.3934/molsci.2016.3.386
- Ali, S., Søndergaard, C.R., Teixeira, S., Pickersgill, R.W., 2015. Structural insights into the loss of catalytic competence in pectate lyase activity at low pH. *FEBS Lett.* 589, 3242–3246. doi:10.1016/j.febslet.2015.09.014
- Alvindia, D.G., Hirooka, Y., 2011. Identification of *Clonostachys* and *Trichoderma* spp. from banana fruit surfaces by cultural, morphological and molecular methods. *Mycology* 2, 109–115. doi:10.1080/21501203.2011.554904
- Alvindia, D.G., Natsuaki, K.T., 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Prot.* 27, 1200–1207. doi:10.1016/j.cropro.2008.02.007
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093
- Anderson, C.T., 2016. We be jammin': An update on pectin biosynthesis, trafficking and dynamics. *J. Exp. Bot.* 67, 495–502. doi:10.1093/jxb/erv501
- Arantes, V., Saddler, J.N., 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol. Biofuels* 3, 1–11. doi:10.1186/1754-6834-3-4
- Ardèvol, A., Rovira, C., 2015. Reaction Mechanisms in Carbohydrate-Active Enzymes: Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Insights from ab Initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Dynamic Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 7528–7547. doi:10.1021/jacs.5b01156
- Atmodjo, M.A., Hao, Z., Mohnen, D., 2013. Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 747–779. doi:10.1146/annurev-plant-042811-105534
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., Pesquet, E., 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Ann. Bot.* 115, 1053–1074. doi:10.1093/aob/mcv046

- Beeson, W.T., Phillips, C.M., Cate, J.H.D., Marletta, M.A., 2012. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 890–892. doi:10.1021/ja210657t
- Beeson, W.T., Vu, V. V., Span, E.A., Phillips, C.M., Marletta, M.A., 2015. Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 923–946. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034439
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 36, 91–106. doi:10.1016/j.rser.2014.04.047
- Bettiol, W., Morandi, M.A.B., Pinto, Z.V., de Paula Júnior, T.J., Corrêa, É.B., Moura, A.B., Lucon, C.M.M., Costa, J. de C. do B., Bezerra, J.L., 2012. Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas, Embrapa Meio Ambiente Documento 88.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519–46. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938
- Bonawitz, N.D., Chapple, C., 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu Rev Genet* 44, 337–63. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163508
- Bouws, H., Wattenberg, A., Zorn, H., 2008. Fungal secretomes - Nature's toolbox for white biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 381–388. doi:10.1007/s00253-008-1572-5
- Brasil, 2015. Mapeamento do Uso e Cobertura do Cerrado: Projeto TerraClass Cerrado 2013. Mapeamento do Uso e Cober. do Cerrado Proj. TerraClass Cerrado 2013.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S., 2011. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Res.* 2011, 1–17. doi:10.4061/2011/787532
- Brummell, D.A., 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* 33, 103–119. doi:10.1071/FP05234
- Brummell, D.A., Harpster, M., 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47, 311–40.
- Buckeridge, M.S., 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiol.* 154, 1017–1023. doi:10.1104/pp.110.158642
- Busse-Wicher, M., Gomes, T.C.F., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N.J., Bolam, D.N., Skaf, M.S., Dupree, P., 2014. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 79, 492–506. doi:10.1111/tpj.12575
- Caffall, K.H., Mohnen, D., 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344, 1879–900. doi:10.1016/j.carres.2009.05.021

- Cantarel, B.I., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZY): An expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res.* 37, 233–238. doi:10.1093/nar/gkn663
- Charnock, S.J., Brown, I.E., Turkenburg, J.P., Black, G.W., Davies, G.J., 2002. Convergent evolution sheds light on the anti-beta -elimination mechanism common to family 1 and 10 polysaccharide lyases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12067–12072. doi:10.1073/pnas.182431199
- Chatterton, S., Punja, Z.K., 2009. Chitinase and β -1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Can. J. Microbiol.* 55, 356–367.
- Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P., Gupta, N., 2012. Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1817–1830. doi:10.1007/s00253-012-3887-5
- Cosgrove, D.J., 2014. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22, 122–131. doi:10.1016/j.pbi.2014.11.001
- Cosgrove, D.J., Jarvis, M.C., 2012. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front. Plant Sci.* 3, 1–7. doi:10.3389/fpls.2012.00204
- Cota, L. V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E.F., 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biol. Control* 50, 222–230. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.04.017
- Coughlan, M.P., Tuohy, M.G., Ferreira Filho, E.X., Puls, J., Claeysens, M., Vrsanská, M., Hughes, M.M., 1993. Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems, in: Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P. (Eds.), *Hemicellulose and Hemicellulases*. Portland Press, Cambridge, pp. 53–84.
- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., 2014. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal Biol. Rev.* 28, 97–125. doi:10.1016/j.fbr.2014.11.001
- Daher, F.B., Braybrook, S. a., 2015. How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Front. Plant Sci.* 6, 1–8. doi:10.3389/fpls.2015.00523
- Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zabolina, O.A., Hong, M., 2011. Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry* 50, 989–1000. doi:10.1021/bi101795q
- Ding, S.Y., Zhao, S., Zeng, Y., 2014. Size, shape, and arrangement of native cellulose fibrils in maize cell walls. *Cellulose* 21, 863–871. doi:10.1007/s10570-013-0147-5
- Dodd, D., Cann, I.K.O., 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel

- production. *GCB Bioenergy* 1, 2–17. doi:10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x
- Duarte, G.C., Moreira, L.R.S., Jaramillo, P.M.D., Filho, E.X.F., 2012. Biomass-Derived Inhibitors of Holocellulases. *Bioenergy Res.* 5, 768–777. doi:10.1007/s12155-012-9182-6
- Ellilä, S., Fonseca, L., Uchima, C., Cota, J., Goldman, G.H., Saloheimo, M., Sacon, V., Siika-aho, M., 2017. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnol. Biofuels* 10, 30. doi:10.1186/s13068-017-0717-0
- Endler, A., Persson, S., 2011. Cellulose synthases and synthesis in arabidopsis. *Mol. Plant* 4, 199–211. doi:10.1093/mp/ssq079
- Faik, A., 2010. Xylan biosynthesis: news from the grass. *Plant Physiol.* 153, 396–402. doi:10.1104/pp.110.154237
- FAO, 2010. Burning crop: residues-emission [WWW Document]. URL <http://ref.data.fao.org/dataset?entryId=76a06e13-635c-47e5-a899-d66fd99eb3e6&tab=about> (accessed 10.8.17).
- Fernandes, A.N., Thomas, L.H., Altaner, C.M., Callow, P., Forsyth, V.T., Apperley, D.C., Kennedy, C.J., Jarvis, M.C., 2011. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1195–1203. doi:10.1073/pnas.1108942108
- Frandsen, K.E.H., Simmons, T.J., Dupree, P., Poulsen, J.N., Hemsworth, G.R., Ciano, L., Johnston, E.M., Tovborg, M., Johansen, K.S., Freiesleben, P. Von, Marmuse, L., Fort, S., Cottaz, S., Driguez, H., Henrissat, B., Lenfant, N., Tuna, F., Baldansuren, A., Davies, G.J., Leggio, L. Lo, Walton, P.H., 2016. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monoxygenases. *Nat. Chem. Biol.* 12, 298–303. doi:10.1038/nchembio.2029
- Gonzalez-Vogel, A., Eyzaguirre, J., Oleas, G., Callegari, E., Navarrete, M., 2011. Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 145–55. doi:10.1007/s00253-010-2953-0
- Gross, A.S., Chu, J.W., 2010. On the molecular origins of biomass recalcitrance: The interaction network and solvation structures of cellulose microfibrils. *J. Phys. Chem. B* 114, 13333–13341. doi:10.1021/jp106452m
- Gudynaite-savitch, L., White, T.C., 2016. Fungal Biotechnology for Industrial Enzyme Production: Focus on (Hemi)cellulase Production Strategies, Advances and Challenges, in: Schmol, M., Dattenbock, C. (Eds.), *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Springer, pp. 395–439. doi:10.1007/978-3-319-27951-0
- Guerriero, G., Fugelstad, J., Bulone, V., 2010. What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants? *J. Integr. Plant Biol.* 52, 161–175. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00935.x
- Hall, M., Bansal, P., Lee, J.H., Realff, M.J., Bommarius, A.S., 2010. Cellulose

- crystallinity - A key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *FEBS J.* 277, 1571–1582. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07585.x
- Harreither, W., Sygmond, C., Augustin, M., Narciso, M., Rabinovich, M.L., Gorton, L., Haltrich, D., Ludwig, R., 2011. Catalytic properties and classification of cellobiose dehydrogenases from ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1804–1815. doi:10.1128/AEM.02052-10
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027
- Hervé, C., Rogowski, A., Blake, A.W., Marcus, S.E., Gilbert, H.J., Knox, J.P., 2010. Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15293–15298. doi:10.1073/pnas.1005732107
- Hill, J.L., Hammudi, M.B., Tien, M., 2014. The Arabidopsis cellulose synthase complex: a proposed hexamer of CESA trimers in an equimolar stoichiometry. *Plant Cell* 26, 4834–42. doi:10.1105/tpc.114.131193
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G., 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 5, 45. doi:10.1186/1754-6834-5-45
- Hosoya, T., Matsuoka, T., Serizawa, N., Furuya, K., 1995. Two morphological groups derived from *Clonostachys cylindrospora* and their relationship to trans-4-hydroxy-(L)-proline productivity. *Mycoscience* 36, 193–197.
- Jaramillo, P.M.D., Gomes, H.A.R., Monclaro, A. V., Silva, C.O.G., Ferreira Filho, E.X.F., 2015. Lignocellulose-degrading enzymes: an overview of the global market, in: Gupta, V.K., Mach, R.L., Sreenivasaprasad, S. (Eds.), *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*. Willey Blackwell, West Sussex, pp. 75–85.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40, 2931–2944. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026
- Jensen, M.H., Otten, H., Christensen, U., Borchert, T. V., Christensen, L.L.H., Larsen, S., Leggio, L. Lo, 2010. Structural and biochemical studies elucidate the mechanism of rhamnogalacturonan lyase from *Aspergillus aculeatus*. *J. Mol. Biol.* 404, 100–111. doi:10.1016/j.jmb.2010.09.013
- Juturu, V., Wu, J.C., 2013. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 353–363. doi:10.1002/jctb.3969
- Juturu, V., Wu, J.C. huan, 2014. Microbial exo-xylanases: a mini review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, 81–92. doi:10.1007/s12010-014-1042-8
- Karlsson, M., Durling, M.B., Choi, J., Kosawang, C., Lackner, G., Tzelepis, G.D., Nygren, K., Dubey, M.K., Kamou, N., Levasseur, A., Zapparata, A., Wang, J., Amby, D.B., Jensen, B., Sarrocco, S., Panteris, E., Lagopodi, A.L., Pöggeler, S., Vannacci, G., Collinge, D.B., Hoffmeister, D., Henrissat, B.,

- Lee, Y.H., Jensen, D.F., 2015. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *clonostachys rosea*. *Genome Biol. Evol.* 7, 465–480. doi:10.1093/gbe/evu292
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 215–27.
- Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 199, 42–48. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.085
- King, B.C., Waxman, K.D., Nenni, N. V, Walker, L.P., Bergstrom, G.C., Gibson, D.M., 2011. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnol. Biofuels* 4, 4. doi:10.1186/1754-6834-4-4
- Kostylev, M., Wilson, D., 2012. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels* 3, 61–70. doi:10.4155/bfs.11.150
- Krauss, U., ten Hoopen, M., Rees, R., Stirrup, T., Argyle, T., George, A., Arroyo, C., Corrales, E., Casanoves, F., 2013. Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biol. Control* 67, 317–327. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.011
- Lagaert, S., Beliën, T., Volckaert, G., 2009. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 1064–73. doi:10.1016/j.semcd.2009.05.008
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol. Biofuels* 6, 41. doi:10.1186/1754-6834-6-41
- Li, S., Bashline, L., Zheng, Y., Xin, X., Huang, S., Kong, Z., Kim, S.H., Cosgrove, D.J., Gu, Y., 2016. Cellulose synthase complexes act in a concerted fashion to synthesize highly aggregated cellulose in secondary cell walls of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 11348–11353. doi:10.1073/pnas.1613273113
- Liu, Y.S., Baker, J.O., Zeng, Y., Himmel, M.E., Haas, T., Ding, S.Y., 2011. Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. *J. Biol. Chem.* 286, 11195–11201. doi:10.1074/jbc.M110.216556
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, 490–495. doi:10.1093/nar/gkt1178
- Luongo, L., Galli, M., Corazza, L., Meekes, E., Haas, L. De, Van Der Plas, C.L., Köhl, J., 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Sci. Technol.* 15, 229–242. doi:10.1080/09583150400016852
- Lygin, A. V., Upton, J., Dohleman, F.G., Juvik, J., Zabortina, O.A., Widholm, J.M., Lozovaya, V. V., 2011. Composition of cell wall phenolics and

- polysaccharides of the potential bioenergy crop -Miscanthus. *GCB Bioenergy* 3, 333–345. doi:10.1111/j.1757-1707.2011.01091.x
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577. doi:10.1128/MMBR.66.3.506
- Ma, G., Zhu, W., Liu, Y., 2016. QM/MM studies on the calcium-assisted b - elimination mechanism of pectate lyase from *Bacillus subtilis*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 1606–1615. doi:10.1002/prot.25103
- Malgas, S., van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2015. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1167–1175. doi:10.1007/s11274-015-1878-2
- Meng, X., Ragauskas, A.J., 2014. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 150–158. doi:10.1016/j.copbio.2014.01.014
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., Molina, A., 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5, 358. doi:10.3389/fpls.2014.00358
- Mittal, A., Katahira, R., Himmel, M.E., Johnson, D.K., 2011. Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels* 4, 41. doi:10.1186/1754-6834-4-41
- Monclaro, A.V., Filho, E.X.F., 2017. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: Recent developments and application in lignocellulose breakdown. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 771–778. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.077
- Moreira, G.M., Abreu, L.M., Carvalho, V.G., Schroers, H.J., Pfenning, L.H., 2016. Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycol. Prog.* 15, 1031–1039. doi:10.1007/s11557-016-1224-6
- Moreira, L.R.S., Filho, E.X.F., 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 165–78. doi:10.1007/s00253-008-1423-4
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025
- Newman, R.H., Hill, S.J., Harris, P.J., 2013. Wide-Angle X-Ray Scattering and Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Data Combined to Test Models for Cellulose Microfibrils in Mung Bean Cell Walls 1. *Plant Physiol.* 163, 1558–1567. doi:10.1104/pp.113.228262
- Nishiyama, Y., 2009. Structure and properties of the cellulose microfibril. *J. Wood Sci.* 55, 241–249. doi:10.1007/s10086-009-1029-1

- Ohtsuki, T., Suyanto, Yazaki, S., Ui, S., Mimura, a, 2005. Production of large multienzyme complex by aerobic thermophilic fungus *Chaetomium* sp. nov. MS-017 grown on palm oil mill fibre. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 111–6. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01644.x
- Oliveira, D.M., Finger-Teixeira, A., Rodrigues Mota, T., Salvador, V.H., Moreira-Vilar, F.C., Correa Molinari, H.B., Craig Mitchell, R.A., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O., Dantas dos Santos, W., 2015. Ferulic acid: A key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnol. J.* 13, 1224–1232. doi:10.1111/pbi.12292
- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V.J., Kirby, A.R., Quesada, M.A., Mercado, J.A., 2014. Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Ann. Bot.* 114, 1375–1383. doi:10.1093/aob/mcu149
- Park, Y.B., Cosgrove, D.J., 2015. Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiol.* 56, 180–194. doi:10.1093/pcp/pcu204
- Parthasarathi, R., Bellesia, G., Chundawat, S.P.S., Dale, B.E., Langan, P., Gnanakaran, S., 2011. Insights into hydrogen bonding and stacking interactions in cellulose. *J. Phys. Chem. A* 115, 14191–14202. doi:10.1021/jp203620x
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., Xiong, G., 2013. Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238, 627–642. doi:10.1007/s00425-013-1921-1
- Pauly, M., Keegstra, K., 2008. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J.* 54, 559–68. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x
- Payne, C.M., Resch, M.G., Chen, L., Crowley, M.F., Himmel, M.E., Taylor, L.E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., Stals, I., Tan, Z., Beckham, G.T., 2013. Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose-degrading enzymes dynamically bind to cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 14646–14651. doi:10.1073/pnas.1309106110
- Peterson, R., Nevalainen, H., 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - Thirty years of strain improvement. *Microbiology* 158, 58–68. doi:10.1099/mic.0.054031-0
- Phillips, C.M., Beeson, W.T., Cate, J.H., Marletta, M.A., 2011. Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chem. Biol.* 6, 1399–1406.
- Pinkerton, M., 1936. A comparative study of conidial formation in *Cephalosporium* and some related Hyphomycetes. *Ann Missouri Bot Gard* 23, 1–69.
- Popper, Z.A., Michel, G., Herve, C., Domozych, D.S., Willats, W.G., Tuohy, M.G., Kloareg, B., Stengel, D.B., 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* 62, 567–590.

doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103809

- Rahikainen, J.L., Martin-Sampedro, R., Heikkinen, H., Rovio, S., Marjamaa, K., Tamminen, T., Rojas, O.J., Kruus, K., 2013. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. *Bioresour. Technol.* 133, 270–278. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.075
- Ramos, L.P., 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova* 26, 863–871. doi:10.1590/S0100-40422003000600015
- Rennie, E.A., Scheller, H.V., 2014. Xylan biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 100–107. doi:10.1016/j.copbio.2013.11.013
- Ridley, B.L., Neill, M.A.O., Mohnen, D., 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929–967.
- Rodríguez-Gacio, M., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., Matilla, A.J., 2012. Softening-up mannan-rich cell walls. *J. Exp. Bot.* 63, 3975–3988. doi:10.1093/jxb/err313
- Rodriguez, M.A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N., Godeas, A., 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: Mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1177–1186. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04970.x
- Sarrocco, S., Guidi, L., Fambrini, S., Degl’Innocenti, E., Vannacci, G., 2009. Competition for cellulose exploitation between *Rhizoctonia solani* and two *Trichoderma* isolates in the decomposition of wheat straw. *J. Plant Pathol.* 91, 331–338.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112315
- Schroers, H., 2001a. A monograph of *Bionectria* and its *Clonostachys* anamorphs. *Stud. Mycol.* 46, 1–96.
- Schroers, H., 2001b. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Stud. Mycol.* 1–96.
- Schroers, H.J., Samuels, G.J., 1997. *Bionectria*: a genus for species of *Nectria ochroleuca* group. *Zeitschrift Fur Mykol.* 62, 149–154.
- Schroers, H.J., Samuels, G.J., Seifert, K.A., Gams, W., 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91, 365–385.
- Sciuto, D., Almeida, R., Miller, R., Moreira, L.R.S., Filho, E.X.F., 2017. Cellulose-degrading enzyme production by *Clonostachys byssicola*: Partial purification and characterization of an endoglucanase. *Mycosphere* 8, 415–431. doi:10.5943/mycosphere/8/3/4
- Sette, L.D., Passarini, A.M.R.Z., Delarmelina, A.C., Salati, A.F., Duarte, M.C.T., 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic

- fungi from coffee plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1185–1195. doi:10.1007/s11274-006-9160-2
- Seyedarabi, A., To, T.T., Ali, S., Hussain, S., Fries, M., Madsen, R., Clausen, M.H., Teixeira, S., Brocklehurst, K., Pickersgill, R.W., 2010. Structural Insights into Substrate Specificity and the anti β -Elimination Mechanism of Pectate Lyase. *Biochemistry* 49, 539–546. doi:10.1021/bi901503g
- Sheldon, R.A., 2014. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem.* 16, 950–963. doi:10.1039/C3GC41935E
- Silva, A.J., Gómez-Mendoza, D.P., Junqueira, M., Domont, G.B., Queiroz, R.M.L., de Sousa, M.V., Filho, E.X.F., Ricart, C.A.O., 2015. Secretomic Analysis Reveals Multi-Enzymatic Complexes in *Trichoderma reesei* Grown in Media Containing Lactose or Galactose. *BioEnergy Res.* 8, 1906–1911. doi:10.1007/s12155-015-9648-4
- Silva, C. de O.G., Ferreira Filho, E.X., 2017. A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. *Bioenergy Res.* 10, 592–602. doi:10.1007/s12155-017-9815-x
- Silva, G.G.D., Couturier, M., Berrin, J.G., Buléon, A., Rouau, X., 2012. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 103, 192–200. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.073
- Silva, A.J. Da, Gómez-Mendoza, D.P., Junqueira, M., Domont, G.B., Ximenes Ferreira Filho, E., de Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., 2012. Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. *Proteomics* 12, 2729–38. doi:10.1002/pmic.201200048
- Silveira, R.L., Stoyanov, S.R., Gusarov, S., Skaf, M.S., Kovalenko, A., 2013. Plant Biomass Recalcitrance: Effect of Hemicellulose Composition on Nanoscale Forces that Control Cell Wall Strength. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 19048–19051.
- Siqueira, F.G. De, Ferreira Filho, E.X., 2010. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. *Mini. Rev. Org. Chem.* 7, 54–60.
- Siqueira, F.G. de, Siqueira, E.G. de, Jaramillo, P.M.D., Silveira, M.H.L., Andreus, J., Couto, F.A., Batista, L.R., Filho, E.X.F., 2010. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 64, 20–26. doi:10.1016/j.ibiod.2009.10.002
- Sorensen, I., Domozych, D., Willats, W.G.T., 2010. How Have Plant Cell Walls Evolved? *Plant Physiol.* 153, 366–372. doi:10.1104/pp.110.154427
- Tan, T.-C., Kracher, D., Gandini, R., Sygmund, C., Kittl, R., Haltrich, D., Hällberg, B.M., Ludwig, R., Divne, C., 2015. Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. *Nat. Commun.* 6, 7542. doi:10.1038/ncomms8542

- Thomas, L.H., Forsyth, V.T., Sturcova, A., Kennedy, C.J., May, R.P., Altaner, C.M., Apperley, D.C., Wess, T.J., Jarvis, M.C., 2013. Structure of Cellulose Microfibrils in Primary Cell Walls from Collenchyma. *Plant Physiol.* 161, 465–476. doi:10.1104/pp.112.206359
- van den Brink, J., de Vries, R.P., 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1477–92. doi:10.1007/s00253-011-3473-2
- van Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K., Görgens, J.F., 2010. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochem.* 45, 1203–1213. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.011
- Várnai, A., Costa, T.H., Faulds, C.B., Milagres, A.M., Siika-Aho, M., Ferraz, A., 2014. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, p-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. *Biotechnol. Biofuels* 7, 153. doi:10.1186/s13068-014-0153-3
- Vidal Jr., B.C., Dien, B.S., Ting, K.C., Singh, V., 2011. Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion - A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1405–1421. doi:10.1007/s12010-011-9221-3
- Villares, A., Moreau, C., Bennati-Granier, C., Garajova, S., Foucat, L., Falourd, X., Saake, B., Berrin, J.-G., Cathala, B., 2017. Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. *Sci. Rep.* 7, 40262. doi:10.1038/srep40262
- Weng, J.-K., Chapple, C., 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.* 187, 273–285. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x
- Westereng, B., Cannella, D., Wittrup Agger, J., Jørgensen, H., Larsen Andersen, M., Eijsink, V.G.H., Felby, C., 2016. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. *Sci. Rep.* 5, 18561. doi:10.1038/srep18561
- Willför, S., Sundberg, a., Hemming, J., Holmbom, B., 2005a. Polysaccharides in some industrially important softwood species. *Wood Sci. Technol.* 39, 245–257. doi:10.1007/s00226-004-0280-2
- Willför, S., Sundberg, a., Pranovich, a., Holmbom, B., 2005b. Polysaccharides in some industrially important hardwood species. *Wood Sci. Technol.* 39, 601–617. doi:10.1007/s00226-005-0039-4
- Withers, S.G., 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr. Polym.* 44, 325–337. doi:10.1016/S0144-8617(00)00249-6
- Wong, D., 2008. Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *Protein J.* 27, 30–42. doi:10.1007/s10930-007-9105-0
- Yang, H., Chen, J., Chen, Q., Wang, K., Sun, R.C., 2015. The Synergic Relationship Between Xylan Removal and Enhanced Cellulose Digestibility for Bioethanol Production: Reactive Area, Crystallinity, and Inhibition. *Bioenergy Res.* 8, 1847–1855. doi:10.1007/s12155-015-9642-x

- Yohalem, D.S., Nielsen, K., Green, H., Jensen, D.F., 2004. Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 297–303. doi:10.1016/S0168-6496(03)00299-X
- Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hallberg, B.M., Divne, C., Nicholls, P., Haltrich, D., 2006. Cellobiose Dehydrogenase – A Flavocytochrome from Wood-Degrading , Phytopathogenic and Saprotropic Fungi. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7, 255–280.
- Zhang, Y.P., 2011. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 29, 715–725. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.020
- Zhong, R., Ye, Z.H., 2015. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol.* 56, 195–214. doi:10.1093/pcp/pcu140

Capítulo 2

*Identificação de complexos
multienzimáticos em secretomas de
Clonostachys byssicola produzidos em
resposta a diferentes fontes de carbono
lignocelulósicas.*

Introdução

Os resíduos agrícolas são gerados anualmente em grandes quantidades. A disposição incorreta deste material, bem como seu acúmulo podem ocasionar impactos ambientais. No entanto, a fração lignocelulósica dos resíduos agrícolas apresenta grande potencial para uso em processos industriais. Os polissacarídeos presentes na parede celular vegetal, uma vez reduzidos aos seus monômeros constituintes, podem ser utilizados na geração de biocombustíveis e outros produtos de valor econômico, através de processos fermentativos ou de sínteses químicas.

A degradação da holocelulose mediada por enzimas é preferível em relação à catálise ácida convencional, uma vez que a atuação enzimática é extremamente específica e ocorre em condições físico-químicas brandas, o que reduz a formação de compostos inibitórios ao crescimento e microrganismos fermentativos. A degradação enzimática da holocelulose requer a ação coordenada de um conjunto diverso de enzimas.

Os sistemas holocelulolíticos produzidos por fungos e bactérias aeróbicas é normalmente descrito como um conjunto de enzimas livres atuando sinergicamente na degradação do substrato. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado uma organização diferente dessas enzimas no secretoma de algumas espécies de bactérias e fungos: diversos complexos multienzimáticos com atividade catalítica têm sido reportados. A organização das enzimas em complexos favorece a atuação cooperativa entre as enzimas, em função da maior proximidade, e contribui para a degradação completa dos polissacarídeos da lignocelulose.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o de identificar e caracterizar complexos multienzimáticos produzidos por *Clonostachys byssicola*, cultivado em diversas fontes de carbono agroindustriais, por meio da técnica de BN-PAGE.



Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources



Helder Andrey Rocha Gomes^a, Adelson Joel da Silva^b, Diana Paola Gómez-Mendoza^c, Agenor Castro Moreira dos Santos Júnior^c, Nicholas de Mojana di Cologna^c, Rosane Mansan Almeida^d, Robert Neil Gerard Miller^d, Wagner Fontes^c, Marcelo Valle de Sousa^c, Carlos André Ornelas Ricart^{c,*}, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho^a

^a Laboratory of Enzymology, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^b Department of Cell Biology and Zoology, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brazil

^c Laboratory of Biochemistry and Protein Chemistry, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^d Laboratory of Microbiology, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Clonostachys byssicola
Lignocellulose-degrading enzymes
Multienzymatic complexes
Blue-Native electrophoresis
LC-MS/MS

ABSTRACT

Multienzymatic complexes with plant lignocellulose-degrading activities have recently been identified in filamentous fungi secretomes. Such complexes have potential biotechnological applications in the degradation of agro-industrial residues. Fungal species from the *Clonostachys* genus have been intensively investigated as bio-control agents; however so far their use as producers of lignocellulose-degrading enzymes has not been extensively explored. Secretomes of *Clonostachys byssicola* following growth on different carbon sources (passion fruit peel, soybean hulls, cotton gin trash, banana stalk, sugarcane bagasse, orange peel, and a composition of soybean hulls: cotton gin trash:orange peel) were subjected to enzymatic assays. Remarkable differences were observed among the samples, especially regarding levels of mannanase and pectinase activities. Secretomes were then subjected to Blue Native PAGE in order to resolve putative protein complexes which subsequently had their composition revealed by trypsin digestion followed by LC-MS/MS analysis. The protein bands (named I, II, III and IV) were shown to be composed by holocellulolytic enzymes, mainly cellulases and xylanases as well as proteins involved in biocontrol processes, such as chitinases and proteases. The high diversity of proteins found in these multicatalytic assemblies confirms *C. byssicola* as a novel source of plant biomass-degrading enzymes.

1. Introduction

Lignocellulosic residues have potential for the generation of several value-added products, such as second generation biofuels. The degradation of plant cell wall polysaccharide constituents (holocellulose) is more attractive when carried out by enzymes, since conventional acid hydrolysis generates fermentation inhibitors, namely furfural and hydroxymethylfurfural. Holocellulose breakdown requires the coordinated and synergic action of cellulases, hemicellulases and pectinases, given the complex organization and interaction of polysaccharides in the plant cell wall that make it a very recalcitrant structure (Selig et al., 2009, 2008; Vardakou et al., 2004; Várnai et al., 2011).

Given the proximity between enzymes in multienzymatic associations they present an increased catalytic efficiency. This is clear when the performance of multienzymatic complexes is compared with free

enzymes during lignocellulose digestion (Zhang, 2011). Some anaerobic bacteria, such as those belonging to the genus *Clostridium*, are able to organize their holocellulolytic enzymes into multienzymatic structures called cellulosomes. Organization of cellulosomes is scaffolding-protein dependent and anchorage to the bacterial cell wall is ensured by the structural proteins coesins and dockerins (Fontes and Gilbert, 2010).

Holocellulolytic systems produced by fungi and aerobic bacteria are often described as sets of free enzymes. However, previous studies have demonstrated the secretion of multienzymatic complexes was involved in lignocellulose breakdown in these organisms, such as the xylanosomes characterized from *Streptomyces olivaceoviridis* and *Chaetomium* sp., (Jiang et al., 2005; Ohtsuki et al., 2005). Similarly, a complex secreted by *Penicillium capsulatum* was characterized and found to be composed of β -glucosidase, laminarinase and lichenase activities (Connelly et al., 1991).

* Corresponding author.

E-mail address: ricart@unb.br (C.A.O. Ricart).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.001>

Received 11 January 2017; Received in revised form 26 May 2017; Accepted 5 June 2017

Available online 10 June 2017

0168-1656/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Studies using Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) have revealed the presence of multienzymatic complexes secreted by filamentous fungi in response to lignocellulosic carbon sources. For instance, enzymatic complexes were described in secretomes produced by *Penicillium purpurogenum* when grown on sugar beet pulp, corn cob, or acetylated xylan, with the composition of these complexes varying according to the carbon source employed (Gonzalez-Vogel et al., 2011). Moreover, complexes composed of cellulases and hemicellulases were reported in *Trichoderma harzianum* grown in liquid media with sugarcane bagasse as the carbon source (Silva et al., 2012). Multienzymatic complexes have also been detected in media containing simple and defined carbon sources. For example, multienzymatic complexes, composed of glycosyl hydrolases, have been identified in secretomes of *T. reesei* following growth on lactose or galactose as carbon sources (Silva et al., 2015).

Within the order Hypocreales, a number of species in the genus *Trichoderma* have been widely employed in biological control (Schmoll and Schuster, 2010). Within the same order, the genus *Clonostachys* comprises both saprophytic and mycoparasitic organisms. Species such as *Clonostachys rosea* have been employed as biological control agents (Schroers, 2001; ten Hoopen et al., 2010) and others like *C. byssicola*, which is commonly found on cocoa (ten Hoopen et al., 2010), have been evaluated (Alvinda and Natsuaki, 2008; Krauss et al., 2013). Considering evidence in the genus *Trichoderma* that mycoparasitic species can also be efficient producers of lignocellulolytic enzymes, including multienzymatic complexes (Silva et al., 2015, 2012), characterization of such enzymes in *Clonostachys* species is warranted. Therefore, the objective of the current study was to detect and characterize multienzymatic complexes in the secretome of *C. byssicola* grown on several lignocellulosic carbon sources, based on BN-PAGE and mass spectrometry analyses.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Solvents employed in mass spectrometric analysis: acetonitrile (ACN), formic acid (FA), and LC-grade water were purchased from Sigma[®] Aldrich Chemical (St. Louis, USA). All substrates were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), unless indicated otherwise. Filter paper (Whatman No.1) was purchased from GE Healthcare, trypsin from Promega (Madison, WI, USA) and Poros R3 reverse-phase materials from Dr. Maisch (Ammerbuch, Germany).

2.2. Lignocellulosic substrates

Soybean hulls (SH), banana stalk (BS) and sugarcane bagasse (SB) were obtained from local farmers in the Brazilian Federal District region. These residues were autoclaved at 121 °C for two hours, extensively washed, dried at 60 °C during 72 h, and milled (Milanezi et al., 2012). Cotton gin waste (CG) was obtained from a cotton processing factory located at Blumenau, SC, Brazil, and subjected to the same pretreatment as SH, BS and SB. Oranges (OP) and passion fruits (PF) were purchased from local retailers in Brasília, Federal District, Brazil. Fruits were peeled, dried at 60 °C during 72 h, and milled.

2.3. Organism identification

The fungal isolate of *C. byssicola* used in this study, previously isolated from soil samples of Brazilian savanna, was deposited under strain code RCFS6 in the fungal culture collection at the Enzymology Laboratory, University of Brasilia, Brazil (genetic heritage number 010237/2015-1). The strain was also deposited in the bank of microorganism for control of plant pathogens and weeds of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). The collection is registered at the World Data Centre for Microorganisms (WDCM), under the

code MCPPW 1128. Stocks were maintained at –80 °C in 50% glycerol.

Species confirmation was conducted through sequence analysis of ribosomal DNA Internal transcribed spacer (rDNA ITS) regions (White et al., 1990), together with a region of the β -tubulin gene (Glass and Donaldson, 1995). Genomic DNA was extracted using a standard phenol-chloroform method. Each PCR reaction contained 10 ng of template DNA, 0.4 μ M of each primer, 200 μ M dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 U Taq DNA polymerase and 1 \times IB Taq polymerase buffer (Phenoltria, Belo Horizonte, MG, Brazil). Temperature cycling comprised an initial denaturation at 95 °C for 4 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 50 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and a final elongation period at 72 °C for 5 min. Purification of amplification products was conducted with ExoSAP-IT[®] (USB, Cleveland, Ohio, USA) and forward and reverse-sequenced using the Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Purified sequences were analyzed on an ABI 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were compared with a nucleotide database (NCBI) using the BLAST algorithm and phylogenetic analysis conducted with the maximum likelihood method using the program MEGA, version 6.06 (Tamura et al., 2013).

The sequences used for identification of the strain were deposited on the GenBank with accession numbers KX259108, for the ITS sequence, and KX259107 for the β -tubulin sequence.

2.4. Cultivation conditions and enzyme production

Aliquots from the strain stored at –80 °C were plated on potato dextrose agar medium, and the plates were incubated at 28 °C during 15 days. After incubation, the spores were harvested by scraping the agar surface and transferred to a solution of 0.9% NaCl and 0.01% Tween 80.

C. byssicola was grown on liquid media containing agro-industrial wastes as carbon sources. Cultivation was carried out in 500 mL erlenmeyer flasks, with 250 mL of mineral medium (g/L: 7.0 KH₂PO₄; 2.0 K₂HPO₄; 0.5 MgSO₄·7H₂O; 1.0 (NH₄)₂SO₄; 0.6 yeast extract; pH 7.0), supplemented with 1% (w/v) of one of the carbon sources (passion fruit peel (PF), soybean hulls (SH), cotton gin trash (CG), banana stalk (BS), sugarcane bagasse (SB), orange peel (OP), and a composition of soybean hulls:cotton gin trash:orange peel (1:1:1) (SCO)) (Milanezi et al., 2012). An aliquot corresponding to 1% (v/v) of the spore suspension (10⁷ spores/mL) was inoculated onto each medium and flasks were incubated at 28 °C under constant agitation at 120 rpm during 15 days. After this, samples were filtered under vacuum through Whatman n°1 filter paper, and the filtrates (hereafter called secretomes) were concentrated and stored at 4 °C for further analysis. Three independent biological replicates were cultivated for each carbon source used.

2.5. Sample concentration

Secretomes were concentrated 10-fold using an Amicon Ultrafiltration System (MILLIPORE, MA, USA) with a 10 kDa cut-off nitrocellulose membrane (MILLIPORE, MA, USA) at 4 °C and maximum pressure of 75 mPa. Concentrated fractions were dialyzed overnight (cellulose membrane, SIGMA, MO, USA) against distilled water, lyophilized and resuspended with Milli-Q water to a volume of 25 mL.

2.6. Enzymatic assays

Secretomes were screened for xylanase, mannanase, pectinase and CMCase activities using oat spelt xylan, galactoglucomannan, citrus pectin and carboxymethylcellulose (CMC) as substrates, respectively (Filho et al., 1993). Briefly, tubes containing 50 μ L of secretome and 100 μ L of substrate at a concentration of 1% (w/v) were incubated at 50 °C during 30 min. All activities were expressed in International Units

(IU), corresponding to the quantity of enzyme able to produce one micromole of reducing sugars per minute. All experiments were carried out with three replicates. The acceptable standard deviation was less than 20% of the mean.

2.7. Total protein quantification

The concentration of total protein was determined using the bicinchoninic acid method (BCA protein assay kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) and bovine serum albumin as standard. Since all the samples were highly pigmented, prior to assay an aliquot of 1 mL of each sample was subjected to trichloroacetic acid (TCA) precipitation, with the resulting pellet then resuspended in the same volume of Milli-Q water.

2.8. Blue Native PAGE (BN-PAGE)

The protocol employed was adapted from methods described previously (Schagger et al., 1994; Wittig et al., 2006). Aliquots of secretomes corresponding to 50 µg of protein were diluted in sample buffer (50 mM Bis-Tris buffer pH 7.0 and 15% glycerol) and loaded onto 5–18% (w/v) polyacrylamide gradient gels. Electrophoretic migration was carried out at 4 °C and 15 mA using an SE 600 Electrophoresis System (Hoefer, San Francisco, CA, USA). The anodic buffer was composed of 50 mM Bis-Tris HCl pH 7.0, and the cathodic buffer, of 50 mM Tricine and 15 mM Bis-Tris HCl pH 7.0 with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue CBB G-250. Native gels were stained with 0.07% (w/v) CBB G-250 (Anderson et al., 1991). Molecular mass markers comprised thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), lactate dehydrogenase (158 kDa), and BSA (67 kDa).

2.9. Zymograms

The cellulolytic and xylanolytic activities were evaluated through agar replica method, as proposed by Béguin (1983). Agar gels of 2.25 mm thickness were prepared with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, and with CMC or xylan at final concentration of 0.1%. BN-PAGE gels were then laid on the agar gels containing the respective substrates. Both gels were pressed against each other with the aid of glass plates, and incubated at 40 °C during 1 h. Thereafter, BN-PAGE gels were stained with Coomassie Blue, and agar gels were stained with Congo Red 0.1% during 30 min, under agitation. Then, the gels were destained with 1 M NaCl, until clear bands appeared. Contrast improvement of the gels was achieved with the addition of acetic acid 0.5%.

2.10. Extraction and decomposition of protein complexes

In order to demonstrate that protein bands observed in BN-PAGE gels were complexes composed of different polypeptides, the bands were excised from gels, and proteins were extracted according to a standard protocol (Hager and Burgess, 1980), with modifications. Protein bands were transferred to microtubes and washed with 2 mL of 3 mM DTT during 15 min. The washing solution was removed and 1 mL of elution buffer (0.3% (w/v) SDS; 0.15 M Tris-HCl pH 7.9; 0.3 mM EDTA; 15 mM DTT and 0.6 M NaCl) was added to each microtube. The bands were then macerated into small pieces, and 1 mL of the same elution buffer was added. Elution was carried out at room temperature for 1 h, with agitation by vortex each 15 min. After elution, tubes were centrifuged at 14,000 rpm during one minute, in order to pelletize acrylamide debris. The supernatants were collected, and transferred to fresh 2 mL microtubes.

In order to extract sufficient protein, six replicates of each secretome were resolved in a single BN-PAGE gel. For each complex, six bands were excised and grouped into two replicates, each comprising three bands. After extraction, the supernatants obtained for each replicate had their volume reduced to 500 µL using a vacuum centrifuge

concentrator. The two replicates were combined to give a final volume of 1 mL of extracted protein for each complex and then subjected to TCA precipitation. Extracted proteins were separated through SDS-PAGE and the gels stained with silver nitrate (Laemmli, 1970).

2.11. In gel digestion of BN-PAGE bands

Protein bands corresponding to putative complexes were excised from BN-PAGE gels, and reduced with 10 mM DTT in 10 mM NH₄HCO₃ during 1 h at 57 °C. DTT was washed out with 10 mM NH₄HCO₃ and the samples alkylated with 55 mM IAA in 10 mM NH₄HCO₃ during 1 h at room temperature in the dark. Bands were then washed twice with 10 mM NH₄HCO₃ and dehydrated with 100% (v/v) ACN. Finally, bands were digested in 50 mM NH₄HCO₃, 200 mM CaCl₂, 100% (v/v) acetonitrile (ACN), and 1 µg/mL of modified porcine trypsin. After overnight incubation at 40 °C, the resulting tryptic peptides were extracted by three cycles of incubation in ACN:water:trifluoroacetic acid (66:33:0.1, v/v/v) and sonication for 10 min (Silva et al., 2012). Extracts were dried in a vacuum centrifuge and reconstituted in 8 µL of 1.0% (v/v) formic acid (FA) solution for MS analysis.

2.12. Nano LC-MS/MS

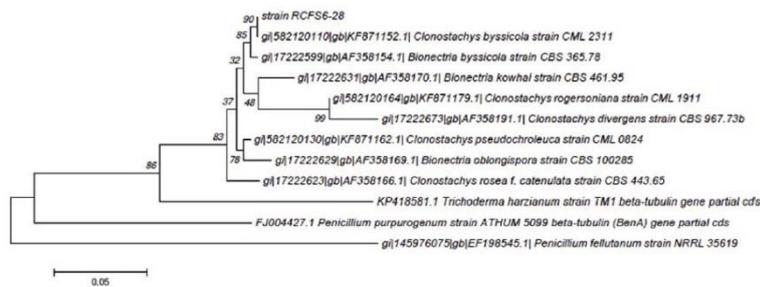
Peptide samples were loaded (1 µg of total peptide) onto a trap column in-house packed with Reprosil-Pur 120 C18-AQ (particle size 5 µm, length 5.0 cm, inner diameter 100 µm, outer diameter 360 µm) using an UltiMate[®] 3000 Nano LC (Dionex, Amsterdam, The Netherlands). After 5 min washing with solvent A (95% (v/v) H₂O, 0.1% (v/v) FA), peptides were eluted during the gradient on an analytical column in-house packed with C18 Reprosil-Pur 120 C18-AQ (particle size 3 µm, length 15 cm, inner diameter 75 µm, outer diameter 360 µm) at a flow rate of 250 nL/min. The gradient comprised 5–20% of solvent B (95% (v/v) ACN, 0.1% (v/v) FA) for 30 min, 20–50% B for 15 min, 50–98% B for 5 min, and 98% B for 10 min. Peptides were dynamically eluted into a LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) via a nanospray probe (Thermo Scientific, Germany) with a spray voltage of 3.02 kV, with transfer capillary temperature set at 275 °C. The mass spectrometer was operated in Data Dependent Acquisition (DDA) mode using Xcalibur 2.2 software (Thermo Scientific). The acquisition cycle consisted of a survey scan from 350–1500 *m/z* at 120,000 resolution (full width at half maximum) at *m/z* 400. In this case, it was used one microscan and 5 × 10⁵ charges on the Orbitrap. An energy collision induced dissociation (HCD) fragmentation under the normalized collision energy of 35% was used in the fragmentation of the 15 most intense multiple charged precursors. The ion selection threshold for MS/MS was set to 1500 counts using a precursor isolation window of 2 amu. Activation parameter “q” and activation time were set to 0.25 and 0.10 ms, respectively. Precursors already fragmented were dynamically excluded during the cycle for a further 30 s.

Data files were analyzed against the *Clonostachys* UNIPROT database (release oct_2015) using PEAKS[®] (Version 7; Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canada). Protein identification criteria included the detection of at least two unique peptides and stringent false-positive discovery rate at 1%. Tolerance filters of 0.5 Da to parent spectra and 10 ppm to tandem MS spectra were employed. Gene ontology analyses were performed using Blast2Go software (<http://www.blast2go.com/b2ghome>).

3. Results and discussion

3.1. Fungal strain identification

Molecular identification of the fungal strain was achieved through analysis of sequence data for rDNA ITS regions and a portion of β-tubulin gene. According to Blastn analysis of the rDNA ITS sequence (data



not shown) and the consensus tree based on alignment of β -tubulin sequences (Fig. 1), strain RCF56 was identified as *C. byssicola*.

3.2. Enzymatic profile of *C. byssicola* secretomes

C. byssicola was grown on media supplemented with different lignocellulosic residues, i.e. passion fruit peel (PF), soybean hulls (SH), cotton gin trash (CG), banana stalk (BS), sugarcane bagasse (SB), orange peel (OP), and a composition of soybean hulls:cotton gin trash:orange peel (1:1:1) (SCO) as the sole carbon source. These lignocellulosic substrates represent abundant agricultural residues from widely cultivated crops in Brazil. In 2013, the production of sugarcane, soybean, cotton, orange, banana and passion fruit comprised 880 million tons (Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2014). Therefore, large amounts of waste products are generated by these crops every year, and inappropriate disposal causes negative environmental impact. A number of strategies have been developed to aggregate value to these residues (including application as feedstock for bioethanol production) leading to a decrease of the amount of discarded waste. Examples of such applications are found in sugarcane bagasse (Sarkar et al., 2012), cotton gin waste (Fockink et al., 2015 Plácido et al., 2013), and banana stalk (Velázquez-Arredondo et al., 2010).

The enzymatic activities (mannanase, xylanase, CMCCase and pectinase) produced by the fungus in each medium are shown in Table 1. The enzymatic activity of each sample can be correlated with the carbohydrate composition of each agricultural residue employed (Table 2). For instance, mannanase activity was higher when *C. byssicola* was cultivated in SH and BS containing media, while the highest pectinase activities were observed in secretomes produced in media supplemented with fruit residues (PF, OP and SCO). Soybean hulls (SH) are known to contain significant amounts of mannan in their cell wall (Odetallah et al., 1997). Fruit residues are rich in pectin, which plays an important role in the fruit ripening process (Brummell and Harpster, 2001). Such abundance explains the high levels of pectinase observed in PF, OP and SCO secretomes. On the other hand, monocot plant cell walls such as sugarcane bagasse (SB), contain lower amounts of pectin (Vogel, 2008). As expected, our study revealed lower pectinase levels following fungus growth on this substrate. Xylanase and CMCCase activities showed less variation among the secretomes, probably because xylan and cellulose are the most common polysaccharides present in all

Table 1
Enzymatic profiles of secretomes of *C. byssicola* following growth on different lignocellulosic substrates. Activity values (IU/mL) are presented with their respective standard deviations.

Substrate	Mannanase	Xylanase	CMCase	Pectinase
PF	0,50 ± 0,01	0,80 ± 0,10	0,32 ± 0,03	0,98 ± 0,07
SH	0,75 ± 0,03	0,84 ± 0,03	0,50 ± 0,01	0,43 ± 0,09
CG	0,46 ± 0,01	0,69 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,41 ± 0,11
BS	0,73 ± 0,02	0,83 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,23 ± 0,10
SB	0,50 ± 0,04	0,80 ± 0,06	0,40 ± 0,02	0,14 ± 0,07
OP	0,39 ± 0,01	0,59 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,97 ± 0,05
SCO	0,65 ± 0,03	0,78 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,97 ± 0,09

Fig. 1. Consensus tree generated by the maximum likelihood method, based upon alignment of β -tubulin sequences for species members of the genus *Clonostachys* and closely related taxa. Figures on branches indicate calculated bootstrap values.

Table 2
Estimated composition of lignocellulosic residues used in this work.

Component	PF ^a	SH ^c	CG ^f	BS ⁱ	SB ^j	OP ^k
Cellulose	43% ^b	35.8%	31%	32.1%	35.5%	26.1%
Hemicellulose	28% ^c	23.1%	16.2% ^g	8.8%	21%	11.9%
Lignin	–	9.1%	20.1% ^h	19%	26.3%	0.2%
Proteins	13.8%	15.4%	–	–	–	–
Pectins	27% ^d	4.2%	–	–	0.2%	17%

^a (Yapo and Koffi, 2008). Values of sugars presented in mol%. The total sugar content of passion fruit cell wall ring is 75% (w/w) in a dry-matter basis.

^b Value of total glucose, in mol%.

^c Value corresponding to (in mol%): xylose 17; manose 4; galactose 4; and arabinose 3.

^d Value corresponding to (in mol%): uronic acid 26; and rhamnose 1.

^e (Rojas et al., 2014).

^f (McIntosh et al., 2014).

^g Sum of xylan (12.2%), Arabinan(2%) and Galactan (2%).

^h Given as Acid Insoluble Lignin.

ⁱ (Velázquez-Arredondo et al., 2010).

^j (Li et al., 2014).

^k (Santi et al., 2014).

plant cell walls.

It is also important to note that in crude SCO extract (composed of equal parts of SH, CG and OP) relatively high levels of mannanase, xylanase and pectinase activities were observed. In this composition, three substrates were mixed, in equal proportions, in order to induce the secretion of significant levels of mannanases and pectinases in the same secretome. SH and OP were used because they contain high amounts of mannan and pectin, respectively, according to the literature (Table 2). CG was also included in the mixture given its high cellulose content, rather than hemicellulose, which is a more recalcitrant substrate. Such a mixture of lignocellulosic substrates is common strategy for optimizing enzyme production, as observed, for instance, in the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* following growth on media containing a mixture of pretreated sugarcane bagasse and wheat bran as carbon source (Camassola and Dillon, 2007).

3.3. BN-PAGE profile of *C. byssicola* secretomes

The secretome samples described above were evaluated for the presence of protein complexes through BN-PAGE. As indicated in Fig. 2, high apparent molecular mass bands, corresponding to putative multiprotein assemblies were detected in all samples. It was also possible to identify some bands as common to different samples and others as specific to a particular lignocellulosic carbon source. The profiles were very reproducible displaying well defined bands and absence of smearing, which indicates specific interactions between the components of the complexes instead of random aggregation of polypeptides (Gonzalez-Vogel et al., 2011). Based on the criteria of molecular mass above 150 kDa and high intensity of band staining, four groups of bands, named I, II, III and IV (Fig. 2), were selected, excised and submitted to trypsin digestion and LC-MS/MS identification. A complete list of proteins identified in the protein bands I–IV is shown in Tables S1 and S2, and a summary of identifications is presented in Table 3.

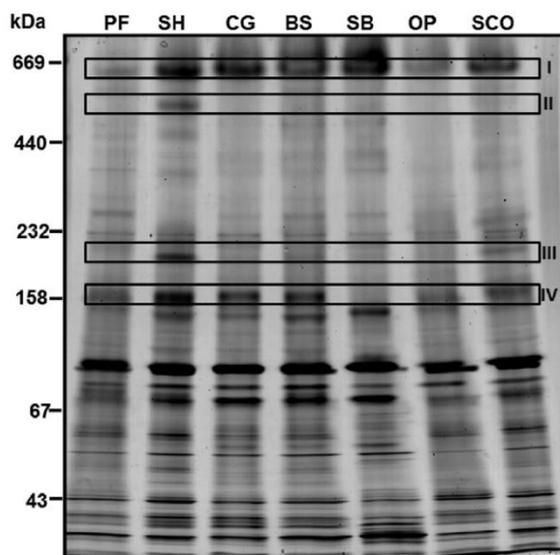


Fig. 2. Blue Native PAGE gel showing bands corresponding to putative protein complexes present in secretomes of *C. byssicola* grown on lignocellulosic substrates: passion fruit peel (PF); soybean hulls (SH); cotton gin waste (CG); banana stem (BS); sugarcane bagasse (SB); orange peel (OP) and soybean hulls: cotton gin waste: orange peel (SCO). Boxes indicate protein bands selected for further identification. I – Complexes PFI, SHI, CGI, BSI, SBI, OPI and SCOI; II- Complex SHII; III – SHIII and SCOIII; IV – Complexes PFIV, SHIV, CGIV, BSIV, OPIV and SCOIV. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The protein bands were found to be composed mainly of carbohydrate-active enzymes, as well as some proteases. It is possible to establish some correlations between the protein composition of each band with the lignocellulosic carbon source employed for cultivation of the fungus. Bands I, of apparent molecular mass of about 669 kDa and present in all the secretomes, share in their composition xylanases, exoglucanases and pectate lyases. A cuticle-degrading protease is also present in most of the bands, being absent only in SB. Some proteins were identified only in bands of certain secretomes. This is the case of alpha-mannosidase, present only in SH, CG and SCO secretomes; endo-beta-galactanase, found in SH and CG secretomes; and GH 61 (AA9), identified in CG and SB secretomes. Several proteins common to bands I, such as xylanases, exoglucanases and cuticle-degrading proteases, were also be found in bands IV. However, other enzymatic activities are present in these bands, suggesting a greater diversity of enzymatic functions. The bands named PF IV, CG IV, BS IV, OP IV and SCO IV share in their composition cellobiose-dehydrogenases, beta-glucosidases, endochitinases and catalase-peroxidases. Lipases were identified in bands PF IV, CG IV, OP IV and SCO IV, and extracellular aldonolactonases in bands PF IV, SH IV, OP IV and SCO IV. Bands SH II, SH III and SCO III are composed of proteins also present in bands I and/or bands IV. However, these bands are distinctive regarding the presence of proteases.

Plant cell wall degrading enzymes and other carbohydrases have been reported in multienzymatic complexes produced by other fungi when grown on lignocellulosic substrates. A previous survey of multi-enzymatic complexes in the secretomes of *Penicillium purpurogenum* grown on several carbon sources (sugar beet pulp, corn cob, or

Table 3

Summarized composition of the protein complexes detected in secretomes of *C. byssicola* grown on lignocellulosic carbon sources. For complete identification information, refer to Tables S1 and S2.

Class	Protein	Bands I							Band II	Bands III			Bands IV				
		PF	SH	CG	BS	SB	OP	SCO	SH	SH	SCO	PF	SH	CG	BS	OP	SCO
Proteases	Cuticle-degrading protease	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Carboxypeptidase		●	●					●								
	Trypsin-like protease									●							
	Dipeptidyl aminopeptidase									●	●				●		●
	Aspartyl-aminopeptidase									●							
Carbohydrate-active enzymes	Endo-1,4-beta-xylanase/GH Family 10	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Endoglucanase	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Exoglucanase	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Alpha-mannosidase		●				●	●	●								
	Endo-beta-galactanase		●	●													
	Glycoside hydrolase family 5	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●		
	Pectate Lyase	●	●	●	●	●	●	●	●		●		●			●	●
	Alpha-glucosidase									●	●						
	Carbohydrate-binding module		●						●								
	Cellobiose-dehydrogenase									●	●	●		●	●	●	●
	Glycoside hydrolase family 61 (AA9)			●		●											
	PHB depolymerase Family esterase		●						●								
	Beta-glucosidase									●	●	●	●	●	●	●	●
	Beta-xylosidase									●	●		●				
	Glycoside hydrolase family 20									●	●	●			●	●	●
	Glycoside hydrolase Family 71									●	●	●		●	●	●	●
	Glycoside hydrolase family 31									●	●	●		●	●	●	●
	Exo-beta-D-glucosaminidase									●	●	●		●	●	●	●
	Glucosylase									●	●	●		●	●		●
	Endochitinase									●	●	●		●	●	●	●
Arabinogalactan-endo-beta-galactosidase											●		●	●	●	●	
FMN-dependent dehydrogenase									●	●							
Catalase peroxidase											●		●	●	●	●	
Other	Hypothetical protein		●						●		●						
	Ribonuclease													●			
	GDSL-like lipase acylhydrolase								●	●	●	●			●	●	●
	Extracellular serine-rich protein									●	●			●			
	ATP-synthase subunit mitochondrial															●	●
	Extracellular aldonolactonase									●	●	●	●			●	●
Dynactin					●												

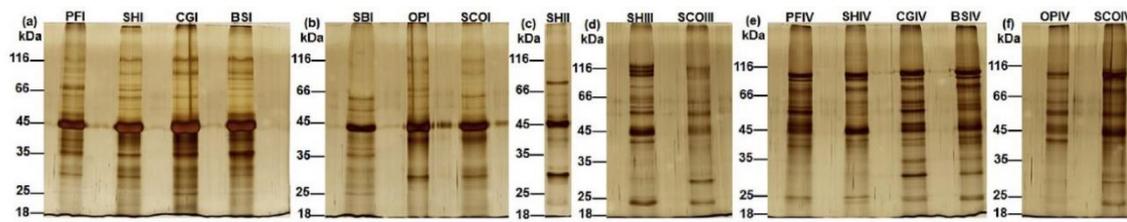


Fig. 3. SDS-PAGE of putative protein complexes extracted from BN-PAGE gels: bands I (a, b), bands II (c) and III (d), and bands IV (e, f). PF (passion fruit), SH (soybean hulls), CG (cotton gin waste), BS (banana stem), SB (sugarcane bagasse), OP (orange peel), SCO (soybean hulls, cotton gin waste, orange peel). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

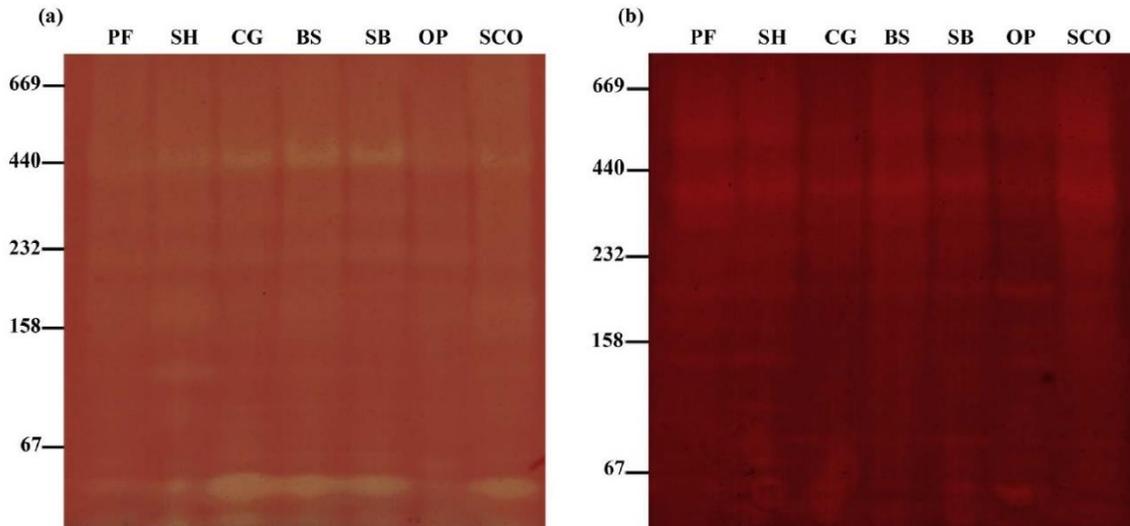


Fig. 4. Zymogram gels revealing xylanolytic (a) and cellulolytic (b) activities of BN-PAGE protein profiles. Fifty micrograms total protein of each secretome were applied in each well. PF – passion fruit peel; SH – soybean hulls, CG – cotton gin waste; BS – banana stem; SB – sugarcane bagasse; OP – orange peel; SCO – soybean hulls: cotton gin waste: orange peel (1:1:1). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

acetylated xylan) also showed high molecular mass bands in BN-PAGE gels that ranged from 200 to 500 kDa (Gonzalez-Vogel et al., 2011). One of these complexes, purified from sugar beet pulp supernatant, was found to be composed of 1,4- α -glucosidase, β -1,6-glucanase, α -L-arabinofuranosidase, alcohol dehydrogenase, acetyl xylan esterase and a cell wall protein. When *T. harzianum* was grown on liquid media containing sugar cane bagasse as sole carbon source, three multienzymatic complexes were detected and identified (Silva et al., 2012). The composition of these complexes included several lignocellulose-degrading enzymes that were also identified in this work, such as cellobiohydrolases, endoglucanases, xylanases, besides amylase and chitinase. A cell wall-anchored endoglucanase was also identified in one of the complexes. In the complexes produced by *P. purpurogenum* and *T. harzianum*, as well as those produced by *C. byssicola*, no cellulosome type structural protein (e.g. scaffoldin) was detected. Further studies are needed to understand how these complexes are assembled and stabilized.

The complexes evaluated in this work harbor a high diversity of carbohydrases (Table 3), which can favor a more complete degradation of lignocellulosic substrates. Regarding cellulases, enzymes that cleave cellulose chains both through hydrolysis (such as exo and endoglucanase, and β -glucosidase), and oxidation (cellobiose-dehydrogenase and lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO)), were identified in the complexes produced by *C. byssicola*. The presence of these enzymes is crucial for the efficient degradation of cellulose, given its high recalcitrance, determined mainly by its crystalline portion (Dimarogona et al., 2013; Zamocky et al., 2006). Besides, enzymes that act on hemicellulose and pectin were also identified, such as xylanases, mannanases, pectate lyases and galactanases. As expected to occur in the natural environment, the organization of such a plethora of

enzymes clearly confers adaptive advantages to fungal species, since these complexes can degrade a high diversity of lignocellulosic substrates, varying in composition, complexity and recalcitrance.

As can be observed in Fig. 1, *C. byssicola* is phylogenetically distant from other species described as complex producers, such as *T. harzianum* and *P. purpurogenum*, which can indicate that the organization of lignocellulolytic enzymes in complexes may be a mechanism more dispersed among fungal species.

Complexes allow the concentration of different enzymes on the substrate, and considering that lignocellulose is made up by an intrinsic and structured network of different polysaccharides, the concerted action of different enzymes clearly favors the complete degradation of this complex substrate. Moreover, multienzymatic complexes have been found to promote the degradation of lignocellulosic substrate more efficiently when compared to non-associated enzymes. This is well known in cellulosomes, in which the organization of different enzymes in determined ratios favors their synergic action (Lynd et al., 2002). In this work, it was not possible to verify the synergic action between the components of the complexes, since it would be necessary to firstly purify complexes by means of chromatography, ultracentrifugation or elution of bands from BN-PAGE gels. Attempts to purify the complexes using those methods are presently being carried out in our laboratory but so far the attempts were not successful (data not shown).

3.4. Decomposition of multiprotein complexes and zymogram

Considering that both protein interactions and protein migration are preserved in BN-PAGE gel electrophoresis, as a result of the negative charge conferred by Coomassie Blue dye, the high molecular weight bands detected in the native gel are likely to correspond to intact

protein complexes. Nonetheless, in order to demonstrate that these bands do in fact correspond to associations of proteins of lower molecular mass, the protein complexes were extracted and submitted to denaturing SDS-PAGE. The results of this decomposition are illustrated in Fig. 3, which shows the presence of bands of different molecular weights, ranging from 20 to up to 116 kDa. Protein profiles varied according to the mass of the original native band, as well as to carbon source on which the fungal strain was cultivated. This is clear, for example, in SB I, which lacks several high molecular protein bands present in all the correspondent complexes (Fig. 3b). The SDS-PAGE profiles of complexes of the same apparent molecular masses were also shown to be distinctive, especially when proteins of low molecular weights were considered (Fig. 3). This fact can corroborate the differences in composition of complexes with the same apparent molecular mass.

In some BN-PAGE bands, especially the bands III and IV, a considerable discrepancy between the apparent mass observed in the gel (Fig. 2) and the sum of the masses of the components of the complexes (Table 3) was observed. The analysis of the data generated from LC-MS/MS was very stringent, so the protein composition most probably is correct. Thus, the high sum of masses of individual components in bands III and IV (this was not observed for bands I and II) could be attributed to co-migration of complexes so that, in the same band two or more complexes could be present. This is a real possibility when bands are excised from complex profiles generated in one-dimensional gels. Another possibility for the discrepancy could be due to the limitations of BN-PAGE for estimation of molecular masses. As proposed before the differences could be due to the differential binding of CBB to the hydrophobic surface of proteins (Heuberger et al., 2002).

The cellulolytic and xylanolytic activities of the complexes detected through BN-PAGE were evaluated by means of agar replicas. The results are illustrated in Fig. 4a (xylan) and b (CMC). In both agar gels, it is possible to identify the presence of clear bands with high molecular weights and displaying xylanolytic and cellulolytic activities. Interestingly, low molecular weight bands showing xylanolytic and cellulolytic activities are present in all samples evaluated, revealing that both free and complexed enzymes are found in the secretomes.

4. Conclusion

In this work, the presence of putative multienzymatic complexes in *Clonostachys bysicola* secretomes when grown in different lignocellulosic carbon sources was demonstrated by means of native and denaturing electrophoretic methods. Protein profiles on Blue native PAGE presented differences according to the carbon source. Also, differences in the composition of the complexes were revealed by LC-MS/MS analysis and showed that they are composed of holocellulolytic enzymes, mainly cellulases and xylanases, as well as proteins involved in biocontrol processes, such as chitinases and proteases.

Acknowledgments

The authors acknowledge the receipt of financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Financy Agency for Studies and Projects (FINEP), Foundation for Research Support of the Federal District (FAPDF – PRONEX FAPDF/0193.001195/2016) and National Institute for Science and Technology of Bioethanol.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.001>.

References

- Alvandia, D.G., Natsuaki, K.T., 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Prot.* 27, 1200–1207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2008.02.007>.
- Anderson, N.L., Esquer-Blasco, R., Hofmann, J.P., Anderson, N.G., 1991. A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. *Electrophoresis* 12, 907–930. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150121110>.
- Béguin, P., 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide using Congo red-stained agar replicas. *Anal. Biochem.* 131, 333–336.
- Brazilian Institute of Geography and Statistics, (IBGE), 2014. Municipal Agricultural Production. IBGE, Rio de Janeiro.
- Brummell, D.A., Harpster, M., 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47, 311–340.
- Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2196–2204. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03458.x>.
- Connelly, I.C., Filho, E.X.F., Healy, a.-M., Fleming, M., Griffin, T.O., Mayer, F., Coughlan, M.P., 1991. Novel carbohydrase complex from solid-state cultures of the aerobic fungus *Penicillium capsulatum*. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 470–477. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90004-T](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(91)90004-T).
- Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2013. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8455–8465. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5197-y>.
- Filho, E.X.F., Puls, J., Coughlan, M.P., 1993. Biochemical characteristics of two endo-beta-1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *J. Ind. Microbiol.* 11, 171–180.
- Fockink, D.H., Adriano, M., Maceno, C., Ramos, L.P., 2015. Production of cellulosic ethanol from cotton processing residues after pretreatment with dilute sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 187, 91–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.096>.
- Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J., 2010. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 655–681. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-091208-085603>.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1323–1330.
- Gonzalez-Vogel, A., Eyzaguirre, J., Oleas, G., Callegari, E., Navarrete, M., 2011. Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 145–155. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2953-0>.
- Hager, D., Burgess, R.R., 1980. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal. Biochem.* 109, 76–86. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90013-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(80)90013-5).
- Heuberger, E.H.M.L., Veenhoff, L.M., Duurkens, R.H., Friesen, R.H.E., Poolman, B., 2002. Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J. Mol. Biol.* 317, 591–600. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2002.5416>.
- Jiang, Z.Q., Deng, W., Li, X.T., Ai, Z.L., Li, L.T., Kusakabe, I., 2005. Characterization of a novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 923–929. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.023>.
- Krauss, U., ten Hoopen, M., Rees, R., Stirrup, T., Argyle, T., George, A., Arroyo, C., Corrales, E., Casanoves, F., 2013. Mycoparasitism by *Clonostachys bysicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biol. Control* 67, 317–327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.011>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Li, J., Zhou, P., Liu, H., Xiong, C., Lin, J., Xiao, W., Gong, Y., Liu, Z., 2014. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 155, 258–265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.113>.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H., Van Pretorius, L.S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>.
- McIntosh, S., Vancov, T., Palmer, J., Morris, S., 2014. Ethanol production from cotton gin trash using optimised dilute acid pretreatment and whole slurry fermentation processes. *Bioresour. Technol.* 173, 42–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.063>.
- Milanezi, N.V.G., Mendoza, D.P.G., Siqueira, F.G., De Silva, L.P., Ricart, C.A.O., Filho, E.X.F., 2012. Isolation and characterization of a xylan-degrading enzyme from *Aspergillus niger* van tieghem LPM 93 with potential for industrial applications. *BioEnergy Res.* 5, 363–371. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-011-9137-3>.
- Odetallah, N.H., Ferket, P.R., Grimes, J.L., McNaughton, J.L., 1997. Effect of mannan-Endo-1, 4-β-Mannosidase on the growth performance of turkeys fed diets containing 44 and 48% crude protein soybean meal. *Poult. Sci.* 81, 1322–1331.
- Ohtsuki, T., Suyanto, Yazaki, S., Ui, S., Mimura, A., 2005. Production of large multi-enzyme complex by aerobic thermophilic fungus *Chaetomium* sp. nov. MS-017 grown on palm oil mill fibre. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 111–116. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01644.x>.
- Plácido, J., Imam, T., Capareda, S., 2013. Evaluation of ligninolytic enzymes,

- ultrasonication and liquid hot water as pretreatments for bioethanol production from cotton gin trash. *Bioresour. Technol.* 139, 203–208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.012>.
- Rojas, M.J., Siqueira, P.F., Miranda, L.C., Tardioli, P.W., Giordano, R.L.C., 2014. Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production. *Ind. Crops Prod.* 61, 202–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.002>.
- Santi, G., Crognaletto, S., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Ruzzi, M., Valentini, R., Moresi, M., 2014. Orange peel pretreatment in a novel lab-scale direct steam-injection apparatus for ethanol production. *Biomass Bioenergy* 61, 146–156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.12.007>.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renew. Energy* 37, 19–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>.
- Schagger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G., 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220–230.
- Schmoll, M., Schuster, A., 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 787–799. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>.
- Schroers, H., 2001. A monograph of *Bionectria* and its *Clonostachys* anamorphs. *Stud. Mycol.* 46, 1–96.
- Selig, M.J., Knoshaug, E.P., Adney, W.S., Himmel, M.E., Decker, S.R., 2008. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresour. Technol.* 99, 4997–5005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.064>.
- Selig, M.J., Adney, W.S., Himmel, M.E., Decker, S.R., 2009. The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Cellulose* 16, 711–722. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-009-9322-0>.
- Silva, A.J., Gómez-Mendoza, D.P., Junqueira, M., Domont, G.B., Ximenes Ferreira Filho, E., de Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., 2012. Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multi-enzymatic complexes. *Proteomics* 12, 2729–2738. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200048>.
- Silva, A.J., Gómez-Mendoza, D.P., Junqueira, M., Domont, G.B., Queiroz, R.M.L., de Sousa, M.V., Filho, E.X.F., Ricart, C.A.O., 2015. Secretomic analysis reveals multi-enzymatic complexes in *trichoderma reesei* grown in media containing lactose or galactose. *BioEnergy Res.* 8, 1906–1911. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-015-9648-4>.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, a., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Várnai, A., Huikko, L., Pere, J., Siika-Aho, M., Viikari, L., 2011. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresour. Technol.* 102, 9096–9104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.059>.
- Vardakou, M., Katapodis, P., Topakas, E., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2004. Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 107–112. [http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00044-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00044-4).
- Velásquez-Arredondo, H.I., Ruiz-Colorado, A.A., De Oliveira, S., 2010. Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: energy analysis. *Energy* 35, 3081–3087. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2010.03.052>.
- Vogel, J., 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 301–307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.002>.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 315–322.
- Wittig, I., Braun, H.-P., Schägger, H., 2006. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 418–428. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.62>.
- Yapo, B.M., Koffi, K.L., 2008. The polysaccharide composition of yellow passion fruit rind cell wall: chemical and macromolecular features of extracted pectins and hemicellulosic polysaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 88, 2125–2133. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa>.
- Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hallberg, B.M., Divne, C., Nicholls, P., Haltrich, D., 2006. Cellobiose dehydrogenase—a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7, 255–280.
- Zhang, Y.-H.P., 2011. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 29, 715–725. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.020>.
- ten Hoopen, G.M., George, A., Martínez, A., Stirrup, T., Flood, J., Krauss, U., 2010. Compatibility between *Clonostachys* isolates with a view to mixed inocula for bio-control. *Mycologia* 102, 1204–1215. <http://dx.doi.org/10.3852/08-095>.

Capítulo 3

*Caracterização do secretoma de
Clonostachys byssicola cultivado em
diversas fontes de carbono.*

Introdução

As gramíneas, designação genérica dada aos membros da família Poaceae (Ordem: Poales), representam um grupo diverso de espécies vegetais. Algumas espécies desse grupo correspondem aos cultivares mais utilizados nas práticas agrícolas desde o início da história da humanidade. Espécies de gramíneas que apresentam grande importância agrícola e econômica incluem trigo, milho, cana-de-açúcar, arroz, sorgo, aveia, dentre outras. Além disso, o interesse por algumas gramíneas para o estabelecimento de culturas dedicadas exclusivamente à geração de energia e químicos renováveis tem crescido. As gramíneas, por realizarem fotossíntese do tipo C4, apresentam maior eficiência na conversão da energia solar em biomassa. Entre as espécies mais estudadas para este propósito, destacam-se *Miscanthus* e *Swithgrass* (van der Weijde et al., 2013). No Brasil, entre as culturas agrícolas de maior importância, destacam-se duas gramíneas: milho e cana-de-açúcar. Segundo dados do IBGE, no ano de 2016 foram colhidos cerca de 830 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e milho (IBGE, 2016). Estima-se que para cada 100 kg de grãos de milho produzidos, são gerados 18 kg de sabugo (Torre et al., 2008), e a cada tonelada de cana-de-açúcar processada, sejam gerados 140 kg de bagaço (Santos et al., 2014).

A parede celular vegetal das gramíneas apresenta atributos químicos e estruturais únicos que permitem diferenciar estas espécies das dicotiledôneas. A hemicelulose predominante nas paredes celulares primárias e secundárias das gramíneas é a glicuronoarabinoxilana, cuja estrutura básica corresponde à uma cadeia principal de resíduos de xilose, lateralmente decorados com resíduos acetil, arabinofuranosil e 4-O-metilglicuronosil. Estes dois últimos substituintes laterais, em particular, são importantes para a recalcitrância da parede celular das gramíneas. Resíduos de ácido ferúlico ou ácido p-coumárico associados às unidades de arabinose podem apresentar-se ligados à resíduos aromáticos da lignina, possibilitando o estabelecimento dos complexos lignina-carboidrato, fundamentais para a manutenção da integridade da estrutura lignocelulósica. As interações com a lignina também são observadas a partir de ligações éster estabelecidas com os resíduos carboxil das unidades de ácido 4-O-

metilglicurônico. As paredes celulares secundárias também apresentam em sua estrutura glicanos de cadeia mista, cuja estrutura apresenta ligações do tipo $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ (Bååth et al., 2016; Hatfield et al., 2017; Scheller and Ulvskov, 2010).

O potencial de microrganismos saprofíticos como fontes de enzimas holocelulolíticas tem sido intensamente investigado nos últimos anos. Os fungos filamentosos recebem um destaque especial nessas pesquisas, uma vez que são capazes de secretar as holocelulases no meio de cultivo, além de demonstrarem capacidade de adaptação ao crescimento nas mais diversas fontes de carbono complexas (Bouws et al., 2008). As espécies do gênero *Trichoderma* têm sido tradicionalmente utilizadas como fonte industrial de holocelulases, em especial de enzimas celulolíticas. Destaca-se a espécie *T. reesei*, que apresenta uso industrial consolidado para a produção de celulases. No entanto, *T. reesei* apresenta em seu genoma um repertório pequeno de genes que codificam enzimas acessórias, como hemicelulases e pectinases (Martinez et al., 2008). Dessa forma, torna-se necessária a busca por outros organismos capazes de produzir estas enzimas, de forma a suplementar os coquetéis celulolíticos já bem estabelecidos de *Trichoderma reesei*. Diversas espécies têm sido estudadas, principalmente as pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, uma vez que já são utilizadas em escala industrial (Gusakov, 2011).

As espécies do gênero *Clonostachys*, em especial *C. rosea*, também são exploradas comercialmente, mas para a produção de formulações com atividade biológica contra fungos fitopatogênicos, uma vez que estas espécies apresentam comportamento de micoparasitismo e competição por nichos e nutrientes com os agentes patogênicos. Apesar do potencial já bem estabelecido como agentes de biocontrole, as espécies do gênero *Clonostachys* são pouco estudadas quanto ao seu potencial de produção de holocelulases de interesse biotecnológico. Recentemente, Gomes et al., (2017) reportaram o potencial de *C. byssicola* como fonte promissora de enzimas lignocelulolíticas, organizadas na forma de complexos multienzimáticos.

Objetivo Geral

Caracterizar o secretoma de *C. byssicola* produzido em resposta a fontes de carbono complexas comerciais e agroindustriais, e avaliar o potencial dos secretomas obtidos em resíduos agrícolas para a sacarificação de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar parcialmente delignificados.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o potencial de *C. byssicola* para produzir holocelulases quando cultivado em resíduos agroindustriais, mais especificamente sabugo de milho, casca do grão da soja, engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar;
2. Caracterizar o secretoma de *C. byssicola* produzido nesses resíduos agrícolas, e também em fontes de carbono complexas comerciais (Avicel, CMC e xilana de aveia), a partir de LC-MS/MS;
3. Avaliar o potencial dos secretomas obtidos em resíduos agrícolas para a sacarificação de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar parcialmente delignificados após tratamento com hidróxido de amônia.

Material e Métodos

Reagentes

Todos os reagentes químicos e substratos para ensaio enzimático foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), exceto quando especificados. Os solventes utilizados nas análises de espectrometria de massas (acetonitrila, ácido fórmico e água de grau de pureza apropriado para LC-MS/MS) também foram adquiridos da Sigma Aldrich. A tripsina utilizada na digestão prévia das proteínas à identificação por LC-MS/MS foi adquirida da Promega (Madison, WI, EUA).

Cultivo do fungo

O isolado de *C. byssicola* utilizado neste trabalho está depositado na micoteca do Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular,

Universidade de Brasília, com subamostra depositada também no Banco de Germoplasma de Microrganismos, Cenargen, Embrapa. A utilização desta linhagem foi autorizada com a concessão de acesso e remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010237/2015-1/CNPq. Além disso, essa micoteca é registrada (registro 1128) no *World Data Center for Microorganism* (WDCM). O fungo foi crescido em meio de cultura líquido contendo os seguintes resíduos como fonte de carbono: Avicel (Av), carboximetilcelulose (CMC), xilana de aveia (X), sabugo de milho (SB), engaço de bananeira (EN), bagaço de cana-de-açúcar (BG) e casca de soja (SJ). Os resíduos agrícolas foram autoclavados a 121°C por 2h, secos a 65°C por 24 horas, e moídos previamente ao uso. Foram realizados cultivos de 50 mL em erlenmeyers de 250 mL para a obtenção do secretoma a ser caracterizado por espectrometria de massas, e cultivos de 500 mL em erlenmeyers de 2 L para a obtenção de secretomas destinados à hidrólise de biomassa. Nos dois casos, o fungo foi cultivado em meio mínimo (g/L: KH_2PO_4 7,0; K_2HPO_4 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; extrato de levedura 0,6) contendo uma das fontes de carbono complexas na concentração de 1% (p/v). A suspensão de esporos foi obtida a partir da raspagem da superfície de placas de *C. byssicola* crescido em ágar batata dextrose (BDA) a 28°C durante 15 dias, em incubadora do tipo BOD programada com fotoperíodo de 12 horas. A partir dessa suspensão de esporos, os meios de cultura foram inoculados com uma concentração de esporos equivalente a aproximadamente 1×10^7 esporos/g de fonte de carbono. Os cultivos foram realizados em triplicata, e os frascos foram incubados a 28°C, sob agitação de 120 rpm, durante 7 dias. Após este período, os cultivos foram filtrados a vácuo, e o material filtrado, denominado extrato bruto (secretoma), foi preservado com azida sódica 0,1%, e utilizado como fontes de enzimas.

Caracterização dos Extratos Brutos

Os extratos brutos foram caracterizados quanto às atividades de mananase, xilanase, carboximetilcelulase (CMCase) e pectinase. Os ensaios para detecção de mananase, xilanase, CMCase e pectinase foram realizados em microescala, utilizando-se 5 µL de extrato bruto e 10 µL dos respectivos substratos: galactomanana 1%, xilana de aveia 1%, CMC 4% e pectina cítrica

1%. Os ensaios foram realizados em microplacas de PCR, que foram incubadas em termociclador a 50°C por 30 min. A detecção de açúcares redutores foi feita segundo o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller, (1959). Foram adicionados 30 µL de DNS, e as microplacas foram submetidas à fervura a 97°C por 10 min. Posteriormente as amostras foram submetidas a leitura a 540 nm. As atividades enzimáticas foram expressas em unidade internacional (U.I), definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol/min nas condições do ensaio. Foram realizadas curvas de calibração utilizando-se manose, xilose, glicose e ácido galacturônico como padrões para o cálculo das atividades de xilanase, CMCase e pectinase, respectivamente.

A caracterização dos secretomas utilizados na sacarificação de biomassa incluiu a determinação da atividade de enzimas ativas contra oligossacarídeos. As atividades de β-glicosidase, β-xilosidase, β-manosidase, α-arabinofuranosidase e β-galactosidase foram determinadas utilizando os substratos sintéticos 4-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNPG), 4-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNPX), 4-nitrofenil-β-D-manopiranosídeo (pNPM), 4-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo (pNPA) e 4-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (pNPGal). Os ensaios foram realizados a partir da adição de 20 µL de secretoma, 100 µL de substrato e 180 µL de tampão acetato pH 5 (100 mM). Os tubos foram incubados a 50°C durante 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 700 µL de carbonato de sódio 1M. As amostras foram lidas a 430 nm, e os valores de atividade enzimática foram calculados com base em uma curva de calibração de 4-nitrofenil (pNP), com quantidades variando na faixa de 0,01-0,1 µmol. A atividade enzimática foi expressa em U.I/mL, que corresponde à quantidade de enzima responsável pela liberação de 1 µmol de pNP por minuto, nas condições do ensaio.

A concentração de proteínas nas amostras de secretoma foi determinada a partir do método proposto por Bradford, utilizando um kit específico (BioRad, Hercules, CA, EUA).

Caracterização dos secretomas por espectrometria de massas

Uma alíquota correspondente a 40 µg de proteína total de cada secretoma foi concentrada e secada em evaporador do tipo *Speed-Vac* durante 2 horas, a

30°C. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em tampão contendo uréia 8M, NaCl 0,0075M e bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 0.05M (pH final do tampão=8,2). Posteriormente, a solução foi acrescida de ditioneína (DTT) na concentração final de 0.005M, e incubada a 55°C durante 25 minutos. Após o período de incubação e resfriamento da solução, uma alíquota de iodoacetamida foi adicionada para uma concentração final de 0,014M, e os tubos permaneceram a temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 40 minutos. O processo de alquilação dos resíduos de cisteína promovido pela iodoacetamida foi interrompido pela adição de DTT (concentração final de 0.005M), e a solução foi diluída, na proporção de 1:5, com TEAB 0.025M (pH 7,9) e cloreto de cálcio (CaCl₂) na concentração final de 0,001M. Foi adicionada tripsina (1 µg/50 µg de proteína total), e a digestão das proteínas foi realizada a 37°C, durante a noite. Posteriormente, a solução foi acidificada pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) na concentração final de 0,5%.

Após a digestão, os peptídeos trípticos foram dessalinizados a partir do uso de *Stage Tips* preenchidas com resina hidrofóbica C18. Os peptídeos foram eluídos da resina a partir de uma série de lavagens sequenciais com os seguintes eluentes: 1) solução de acetonitrila 25% e ácido acético 0,5%; 2) solução de acetonitrila 50% e ácido acético 0,5%; 3) solução de acetonitrila 80% e ácido acético; e 4) acetonitrila 100%. Após a eluição, o eluído contendo os peptídeos trípticos foi evaporado e concentrado em *Speed-Vac*, e quantificado por fluorimetria (Qubit, ThermoFischer Scientific).

LC-MS/MS

Uma carga dos peptídeos trípticos equivalente a 3 µg foi injetada em coluna empacotada com resina Reprosil-Pur 120 C18-AQ (tamanho de partícula de 5 µm, 5 cm de comprimento, diâmetros interno e externo de 100 µm e 360 µm, respectivamente). A coluna foi empacotada utilizando um Nano LC Ultimate 3000 (Dionex, Amsterdã, Holanda). Após lavagem com solvente A (acetonitrila (ACN) 5% (v/v), ácido fórmico (AF) 0,1% (v/v)), os peptídeos foram eluídos durante o gradiente em uma coluna empacotada com a mesma resina (tamanho de partícula 3 µm, 15 cm de comprimento, diâmetros interno e externo de 75 µm e 360 µm, respectivamente), em um fluxo de 250 nL/min. O gradiente consistiu

de uma etapa de 5-20% do solvente B (ACN 95% (v/v), AF 0,1% (v/v)) durante 30 minutos; 20-50% do solvente B durante 15 minutos; 50-98% do solvente B durante 5 minutos; e 98% do solvente B durante 10 minutos. Os peptídeos foram dinamicamente eluídos em um espectrômetro de massas do tipo LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), através de uma sonda do tipo *nanospray* (Thermo Scientific, Alemanha), com uma voltagem de *spray* de 3,02 kV, e temperatura de transferência capilar programada para 275°C. O espectrômetro foi operado no modo de Aquisição Dependente de Dados usando o programa Xcalibur versão 2.2 (Thermo Scientific). O ciclo de aquisição consistiu de um escaneamento na faixa de 350-1500 *m/z* a uma resolução de 120000 (largura completa na metade do máximo) em *m/z* de 400. Foi utilizado um *microscan* de 5×10^5 cargas no Orbitrap. Uma fragmentação por dissociação induzida por colisão (HCD) sob energia normalizada de colisão de 35% foi utilizada na fragmentação dos 15 precursores de carga múltipla mais intensos. O limite de seleção de íons para MS/MS foi programado para 1500 contagens usando uma janela de isolamento de precursor de 2 amu. A ativação do parâmetro "q" e o tempo de ativação foram programados para 0,25 e 0,10 ms, respectivamente. Os precursores previamente fragmentados foram dinamicamente excluídos durante o ciclo por mais 30 segundos.

Identificação das proteínas

Os arquivos foram analisados contra o genoma de *C. rosea* (Karlsson et al., 2015), utilizando o programa Peaks, versão 7 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontário, Canadá). As proteínas foram identificadas considerando a detecção de, pelo menos, dois peptídeos únicos, e uma taxa de descoberta de falsos-positivos (FDR) de 1%. Foram empregados filtros de tolerância de 0,5 Da para espectros parentais e 10 ppm para espectros sequenciais (*tandem*).

As proteínas preditas a partir do genoma de *C. rosea* foram analisadas quanto à presença de domínios conservados de enzimas ativas contra carboidratos a partir de uma busca de similaridade na base de dados dbCAN (Yin et al., 2012), usando o programa *hmmscan* (HMMER3, versão 3.1). Os resultados foram filtrados de acordo com dois parâmetros: *e-value* e tamanho.

Quantificação relativa (*Label Free*)

A análise de variação de abundância das proteínas presentes nos secretomas de *C. byssicola* foi realizada no programa *Progenesis Q1. For Proteomics* (NonLinear Dynamics, Durham, EUA). A partir dos cromatogramas obtidos na aquisição dos dados de LC-MS/MS, foram gerados mapas representativos do perfil protéico de cada amostra. Os mapas dos sete secretomas (Avicel, CMC, xilana, sabugo de milho, casca do grão de soja, engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar) foram comparados, e os dados de abundância normalizada das proteínas entre os secretomas foram avaliados por ANOVA e teste T. Foram obtidos dois resultados principais, a partir da comparação das abundâncias normalizadas das proteínas com os secretomas obtidos em Avicel e xilana de aveia.

Pré-tratamento

Foram utilizados neste trabalho o bagaço da cana-de-açúcar e o sabugo de milho, adquiridos em fazendas na região do Distrito Federal e entorno. Os resíduos previamente moídos foram submetidos a pré-tratamento alcalino com solução de amônia, conforme métodos descritos por Sun et al., (2014) e Chandel et al., (2013), com modificações. Os resíduos foram acondicionados em frascos do tipo Boeco, de 1 L. Para o bagaço, foi adicionada solução de hidróxido de amônio 20% na proporção sólido:líquido de 1:10. Para o sabugo, foi adicionada solução de hidróxido de amônio a 21%, na proporção de 1:6. Os frascos foram incubados a 70°C por 12 horas. O tempo foi reduzido em relação ao preconizado pelos protocolos originais com o intuito de se evitar uma solubilização excessiva de hemicelulose. Após o tratamento alcalino, os resíduos foram extensivamente lavados, até que o pH da água de enxague estivesse neutro. As biomassas foram submetidas à secagem em estufa a 65°C por 24 horas.

Determinação da composição dos resíduos lignocelulósicos

As amostras de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar tratadas e não-tratadas com hidróxido de amônio foram submetidas inicialmente à remoção de extrativos, segundo método estabelecido pelo Laboratório Nacional de

Energia Renovável (NREL), vinculado ao Departamento de Energia dos Estados Unidos (Sluiter et al., 2008a). Uma massa de 1,5 grama de cada biomassa foi acondicionada em papelotes de papel de filtro, e extraídas em extrator de Soxhlet durante 24 horas. Cada amostra foi submetida à duas extrações, sendo uma com água destilada e outra com álcool etílico 95%. Após cada extração, as amostras foram submetidas à secagem, em estufa com circulação de ar, à 60°C por 12 horas. A composição das biomassas também foi realizada a partir de metodologia preconizada pelo NREL (Sluiter et al., 2008b). Este protocolo envolve a hidrólise da biomassa lignocelulósica em duas etapas: uma hidrólise inicial, realizada com ácido sulfúrico 72% (p/p) a 30°C durante 1 hora; e uma segunda hidrólise, na qual o ácido sulfúrico é diluído para 4% (p/p), e a biomassa é novamente hidrolisada por autoclavagem (121°C) durante 1 hora. A partir deste método, também são estabelecidos os teores de lignina ácido solúvel (ASL) e lignina ácido insolúvel (AIL), bem como o teor de cinzas. A determinação da quantidade de açúcares foi determinada por cromatografia de troca aniônica de alta pressão acoplada ao detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em um sistema de cromatografia DIONEX ICS3000 Ion Chromatography DC System (Dionex Co., CA, USA), utilizando coluna e pré-coluna CarboPac PA-1. A corrida foi realizada a 20°C, e fluxo de 0,25 mL/min. As amostras foram eluídas isocriticamente por 60 minutos em solução de hidróxido de sódio 20 mM. Foram utilizados como padrões soluções de glicose, xilose, arabinose, galactose e manose.

Sacarificação

O potencial dos secretomas obtidos a partir do cultivo de *C. byssicola* em fontes de carbono lignocelulósicas foi avaliado. A hidrólise do bagaço de cana e do sabugo de milho pré-tratados foi realizada utilizando-se uma carga total de proteína equivalente a 1 mg por g de substrato lignocelulósico. Foram utilizados os secretomas obtidos após o cultivo do fungo em sabugo de milho (SB), casca do grão da soja (SJ), engaço de bananeira (EN) e bagaço de cana-de-açúcar (BG). Os volumes de extratos brutos correspondentes à carga de proteína utilizada foram completados para 50 mL, utilizando-se tampão fosfato de sódio pH7, 50 mM contendo azida sódica 0,1%. Os extratos brutos foram então

adicionados a erlenmeyers de 250 mL contendo 4 g. do resíduo lignocelulósico. Os frascos foram incubados em shaker rotatório a 150 rpm e 30°C durante 7 dias. A cada 24 horas, uma alíquota do hidrolisado era coletada, submetida à fervura por 10 minutos, e mantida a -20°C, para as análises posteriores de determinação dos açúcares redutores totais e avaliação dos produtos de hidrólise por HPLC-DIONEX. Durante o período de sacarificação, foram incubados controles de secretomas e de substratos.

Estabilidade de xilanases e celulasas ao longo sacarificação

As alíquotas coletadas do controle de cada um dos secretomas foi imediatamente avaliada quanto às atividades de xilanase e CMCase após a coleta, com o objetivo de acompanhar os níveis de atividade dessas duas enzimas durante o experimento de sacarificação.

Determinação dos açúcares redutores totais

A concentração total de açúcares redutores foi determinada em microescala, segundo o método descrito por Miller (1959). À uma alíquota de 30 µL de hidrolisado, apropriadamente diluído, foram adicionados 60 µL de DNS. As amostras foram fervidas a 97°C por 10 minutos, e 45 µL da mistura foram diluídos com 150 µL de água destilada. As amostras foram submetidas à leitura a 540 nm. Uma curva padrão de glicose foi utilizada como referência para calcular a quantidade de açúcares redutores totais.

Determinação do teor de pentoses totais

A concentração de pentoses totais foi determinada pelo método do orcinol férrico (Chaplin, 1986), com adaptações. Uma alíquota de 100 µL de amostra apropriadamente diluída foi misturada com 100 µL de ácido tricloroacético (10% p/v), e os tubos foram fervidos durante 10 minutos. Após a fervura, os tubos foram rapidamente resfriados, e foram adicionados 600 µL de solução de orcinol férrico (sulfato de amônio férrico 1,15% (p/v) e orcinol (0,2% (p/v) em ácido clorídrico 9,6M), e os tubos foram novamente fervidos, durante 20 minutos. As amostras foram resfriadas, e lidas à 660 nm. Uma curva padrão foi montada utilizando-se concentrações apropriadas de xilose.

Determinação do teor de glicose

A determinação do teor de glicose foi realizada utilizando-se um kit comercial à base de glicose oxidase (Doles, Goiânia, Brasil).

Avaliação dos produtos de hidrólise por HPLC-DIONEX

Os produtos de hidrólise foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alta performance acoplada à detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD). Alíquotas devidamente diluídas dos hidrolisados foram analisadas por HPAEC-PAD em um sistema de cromatografia DIONEX ICS3000 Ion Chromatography DC System (Dionex Co., CA, USA), utilizando coluna e pré-coluna CarboPac PA-100 (Thermo Fischer Scientific). A corrida foi realizada a 20°C, e fluxo de 0,25 mL/min. As amostras foram eluídas por 80 minutos em solução de hidróxido de sódio 100 mM, e um gradiente de 0-500 mM de acetato de sódio em hidróxido de sódio 100 mM. Os açúcares redutores foram identificados e quantificados em um detector eletroquímico ED40 (Dionex Co.), e os dados analisados pelo programa Chromeleon 6.8 SR8 (Dionex Co.) Monômeros e oligossacarídeos de diversos graus de polimerização foram utilizados como padrões: Glicose (G1), celobiose (G2), celotriose (G3), celotetraose (G4), celopentaose (G5), celohexaose (G6), xilose (x1), xilobiose (x2), xilotriose (x3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5), xilohexaose (X6), manose (m1), manobiose (m2), manotriose (m3), manotetraose (m4), manopentaose (m5) e manohexaose (m6). Os dados de determinação de açúcares por HPLC, açúcares redutores totais, pentoses totais e glicose total foram analisados por ANOVA *one way*, seguida por teste pareado de Fischer. As análises foram feitas no programa Statistica.

Resultados

Caracterização do secretoma de *C. byssicola*

O nível das atividades de mananase, xilanase, CMCCase e pectinase presente nos cultivos de *C. byssicola* contendo três fontes de carbono complexas comerciais (Avicel, CMC e xilana de aveia) e quatro fontes de carbono agroindustriais (sabugo de milho, casca do grão da soja, engaço de bananeira e bagaço de cana-de-açúcar) foi monitorado durante 7 dias. Os resultados são apresentados na Figura 3.1. Verifica-se uma tendência de que os maiores níveis de atividade enzimática foram observados nos cultivos contendo resíduos agrícolas. Esta tendência foi claramente observada para os níveis de mananase (Fig. 3.1 (a)), CMCCase (Fig. 3.1 (c)) e pectinase (Fig. 3.1 (d)). No que diz respeito as atividades de mananase e CMCCase, a casca de soja e o sabugo de milho induziram os maiores níveis dessas atividades, ao passo que a maior atividade de pectinase foi observada no secretoma produzido em casca de soja. A atividade de xilanase foi maior nos secretomas produzidos em casca de soja, sabugo de milho e xilana de aveia (Fig. 3.1 (b)), evidenciando que os resíduos agroindustriais foram capazes de induzir níveis de atividade semelhantes aos da xilana pura. Os substratos celulósicos utilizados (Avicel e CMC) induziram níveis baixos de atividade de xilanase (Fig. 3.1 (b)) e CMCCase (Fig. 3.1 (c)). Não foram detectados valores consideráveis de atividades de mananase (Fig. 3.1 (a)) e pectinase (Fig. 3.1 (d)).

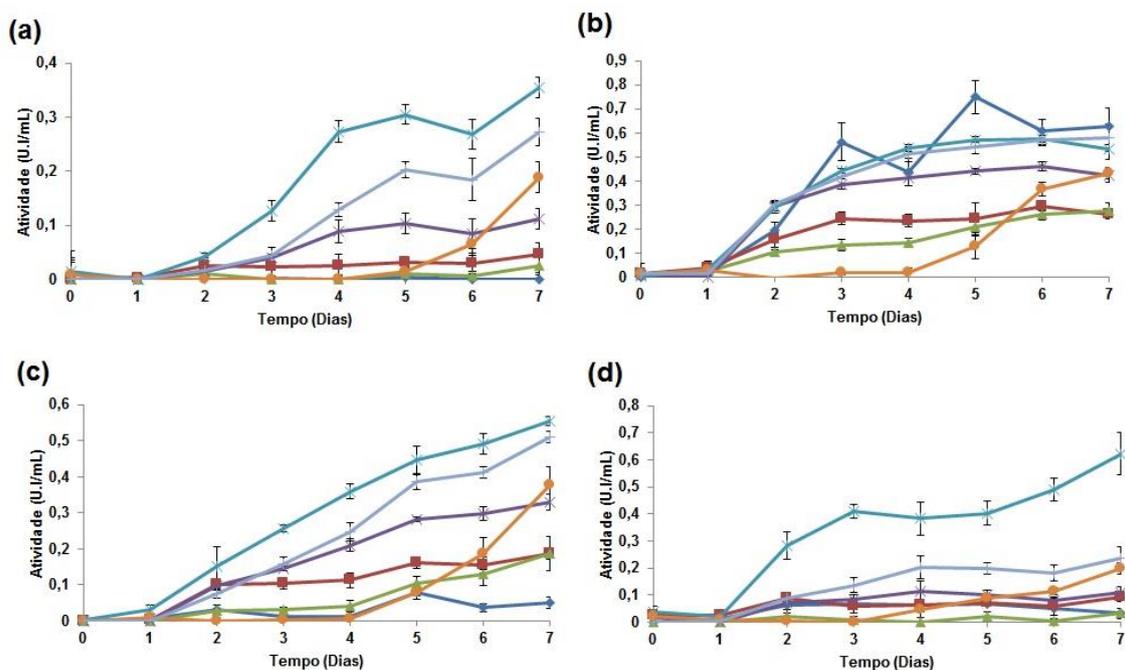


Figura 3.1. Perfil de atividades enzimáticas monitorado durante o cultivo de *Clonostachys byssicola* em diversas fontes de carbono para a caracterização de secretoma. Os valores são apresentados acompanhados das barras de desvios-padrão. Foram avaliados os níveis de mananase (a), xilanase (b), CMCCase (c) e pectinase (d). Fontes de carbono indutoras: xilana de aveia (—▲—), Avicel (—■—), CMC (—■—), sabugo de milho (—×—), casca de soja (—*—), engaço de bananeira (—○—) e bagaço de cana-de-açúcar (—×—).

Os secretomas obtidos após o crescimento de *C. byssicola* nas 7 fontes de carbono complexas foi analisado por LC-MS/MS. Foram identificadas 310 proteínas entre os secretomas analisados, e o agrupamento destas proteínas em relação aos secretomas é apresentado na Tabela A1 (Anexo A). Foram estabelecidos 50 grupos com base na presença de proteínas comuns a determinados secretomas. Um grupo de 23 proteínas foi identificado como comum a todos os secretomas (grupo 1). Ou seja, um pequeno número de proteínas foi produzido em resposta a todos os secretomas. Esse resultado indica que *C. byssicola* produz um conjunto diferente de proteínas em função do resíduo lignocelulósico utilizado em seu crescimento. Três secretomas apresentaram proteínas únicas: Avicel (grupo 48) e casca de soja (grupo 49), com 8 proteínas; e xilana (grupo 50), com 96 proteínas. O secretoma induzido por xilana apresentou grande diferença em relação aos demais secretomas, e este resultado será abordado adiante.

A composição geral dos secretomas analisados é exibida na Figura 3.2. Observa-se que a maioria dos secretomas apresenta-se composto

majoritariamente por enzimas envolvidas na degradação de carboidratos, um resultado já esperado visto que grande parte das proteínas secretadas por fungos filamentosos está relacionada à assimilação de fontes de carbono, uma característica típica de espécies saprófitas, como é o caso de *C. byssicola*. Além de carboidrases, proteases e enzimas relacionadas a outros processos metabólicos foram detectadas, sendo este último grupo de enzimas provavelmente de origem citoplasmática, e liberadas em decorrência de ruptura micelial. O secretoma obtido após o crescimento do fungo em xilana de aveia apresentou composição drasticamente diferente dos demais. Nesse caso, há o predomínio de proteínas relacionadas a outros processos metabólicos, provavelmente estas proteínas são de origem citoplasmática. Este resultado pode evidenciar o crescimento mais acelerado do fungo em resposta especificamente à essa fonte de carbono, ou pode ter experienciado algum tipo de estresse. Ambas as situações podem favorecer a desintegração de hifas, com a consequente liberação de proteínas intracelulares para o meio de cultura.

Um conjunto diverso de enzimas relacionadas à degradação de carboidratos foi identificado a partir da análise dos secretomas de *C. byssicola*. O número de enzimas identificadas para cada secretoma, bem como a classificação dessas enzimas em relação às famílias descritas no CAZy é sumarizado, de forma simplificada, nas Tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4. A descrição das atividades enzimáticas classificadas em cada uma das famílias do CAZy mencionadas neste trabalho é apresentada na Tabela A.2 (Anexo A).

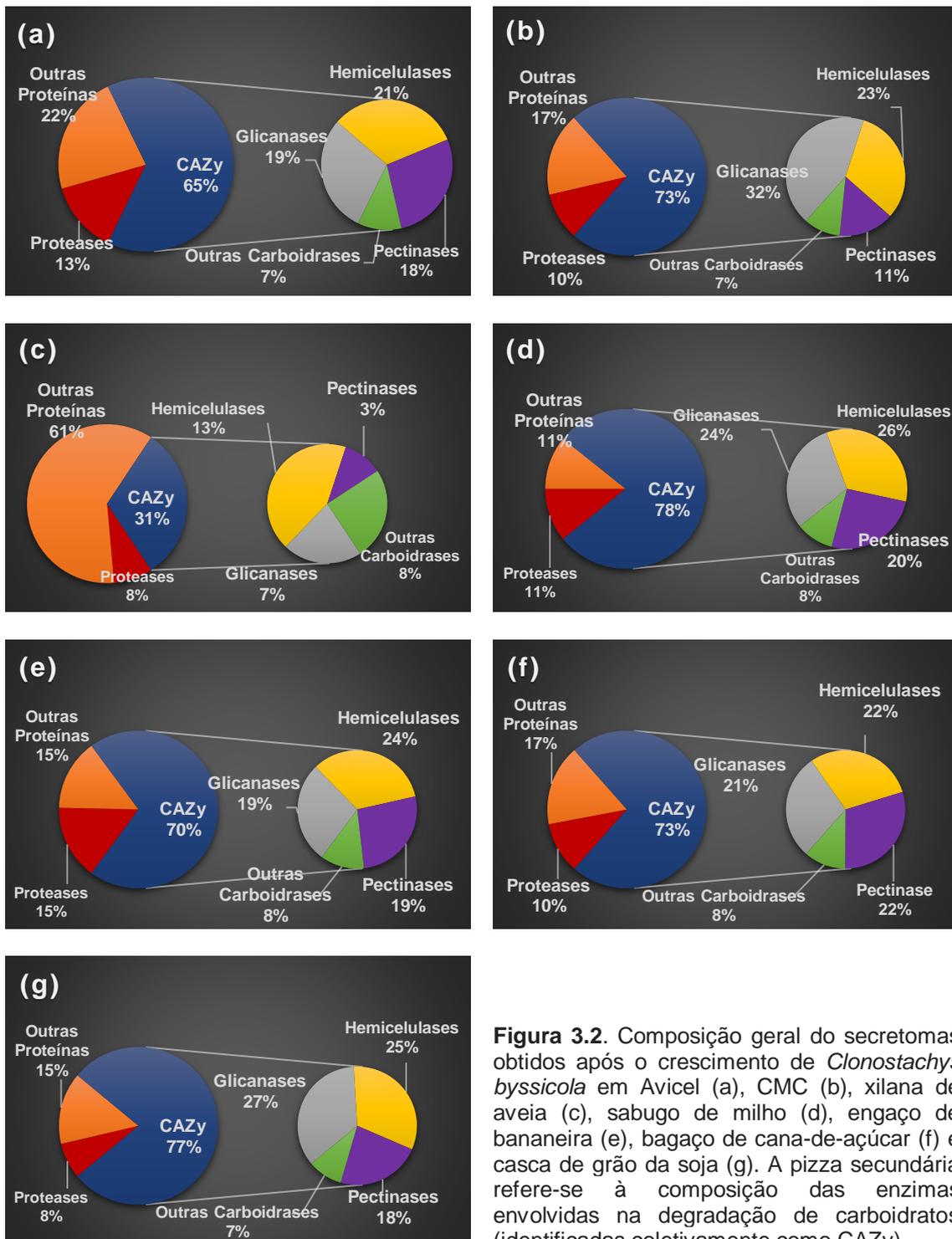


Figura 3.2. Composição geral do secretomas obtidos após o crescimento de *Clonostachys byssicola* em Avicel (a), CMC (b), xilana de aveia (c), sabugo de milho (d), engaço de bananeira (e), bagaço de cana-de-açúcar (f) e casca de grão da soja (g). A pizza secundária refere-se à composição das enzimas envolvidas na degradação de carboidratos (identificadas coletivamente como CAZy).

Os resultados demonstram a capacidade de *C. byssicola* de produzir e secretar sistemas enzimáticos diversos, capazes de degradar as principais frações da parede celular vegetal – celulose, hemicelulose e pectina. Entre as enzimas relacionadas à degradação de celulose (Tabela 3.1), verifica-se a predominância, em termos de número de enzimas identificadas, de oxidases líticas de polissacarídeos cobre-dependentes (LPMO), da família AA9. Estas

oxidases são as enzimas presentes em maior número em todos os secretomas, exceto no secretoma produzido em presença de xilana. Além das LPMOs, as celobiose-desidrogenases da família AA8 também foram identificadas em todos os secretomas, exceto no secretoma induzido por xilana. Estas enzimas oxidativas atuam na degradação da celobiose, e têm sido relatadas como doadoras de elétrons para as LPMOs. Dessa forma, os secretomas produzidos por *C. byssicola* apresentam um sistema de degradação oxidativa da celulose composto por enzimas que atuam de forma sinérgica.

Além das enzimas oxidativas, hidrolases que atuam na degradação da celulose também foram identificadas nos secretomas de *C. byssicola*. Endoglicanases e β -glicosidases foram identificadas em todos os secretomas, enquanto que exoglicanases foram identificadas na maioria dos secretomas, exceto no secretoma produzido em xilana. A presença desses três tipos de enzimas evidencia que o sistema celulolítico produzido por *C. byssicola* é completo e, associado às enzimas oxidativas, apresenta potencial de promover a completa degradação da celulose.

Tabela 3.1. Enzimas relacionadas à degradação ou modificação de glicanos identificadas nos secretomas de *Clonostachys byssicola* cultivado em diversos substratos lignocelulósicos.

Classe	Família CAZy	AV	CMC	X	SB	SJ	EN	BG
Celobiose-desidrogenase	AA8	2	1	-	2	2	2	1
Monooxigenases de polissacarídeos (LPMO)	AA9	13	9	2	12	10	9	10
Endoglicanase	GHs 5, 6 e 7	6	5	1	6	6	6	6
	GH 45	1	1	-	1	1	1	1
Exoglicanase	GHs 6 e 7	5	4	-	4	4	5	3
β-glicosidase	GH3	4	2	2	3	1	3	1
	GH1	-	-	1	-	-	-	-
α/β-glicosidase	GH31	2	1	2	2	2	-	-
β-1,3-glicanosiltransferase	GH72/CBM43	4	2	4	2	1	1	3
Proteína de função desconhecida	GH131	1	1	-	1	1	1	1

Tabela 3.2. Enzimas relacionadas à degradação de pectina identificadas nos secretomas de *Clonostachys byssicola* cultivado em diversos substratos lignocelulósicos.

Classe	Família CAZy	AV	CMC	X	SB	SJ	EN	BG
Exopoligalacturonase	GH28	2	-	-	2	2	2	2
Endopoligalacturonase	GH28	2	-	-	1	-	1	1
α-L-ramnosidase	GH28	-	-	-	-	1	-	-
Pectato liase	PL1	5	1	1	2	2	4	2
Pectina liase	PL1	1	1	-	1	-	1	1
Pectato-trissacarídeo liase	PL1	1	-	-	-	-	1	-
Pectato liase	PL3	6	1	-	5	4	6	2
Ramnogalacturonato liase	PL4	3	-	-	2	2	3	1
Pectato liase	PL9	1	-	-	1	1	1	1
Arabinogalactana-endo-1,4-β-galactanase	GH53	1	1	1	1	1	1	-
Endo-β-1,6-galactanase	GH30	2	2	1	2	2	2	2
Hidrolase de ramnogalacturonil insaturado	GH105	1	-	-	1	1	1	-
Proteína de função desconhecida	GH33	1	-	-	1	1	-	-
	GH78/CBM67	1	-	-	1	-	-	-
	GH93	2	-	-	1	2	-	-
Ramnogalacturonana-acetilesterase	CE12	4	2	-	4	4	4	3
Pectinesterase	CE8	1	-	-	-	1	-	1
α-galactosidase	GH27	-	-	1	-	-	-	-

Tabela 3.3. Enzimas relacionadas à degradação de diferentes frações de hemicelulose nos secretomas de *Clonostachys byssicola* cultivado em diversos substratos lignocelulósicos.

Fração	Classe	Família CAZy	AV	CMC	X	SB	SJ	EN	BG
Xilana	Endo-xilanase	GH10	5	4	4	5	5	5	5
		GH11	2	2	2	2	2	2	2
	β -xilosidase/arabinosidase	GH43	7	-	4	6	5	4	2
	α -N-arabinofuranosidase	GH54/CBM42	2	-	-	2	-	-	-
	α -L-arabinofuranosidase	GH62	1	-	-	1	1	1	-
	Feruloil-esterase	CE1	1	-	-	1	1	1	-
	Proteína de função desconhecida	CE1	1	-	1	1	1	-	-
		CE5	1	1	1	1	1	1	1
	Acetil-xilana esterase	CE1/CBM1	1	1	-	1	1	1	1
	β -xilosidase	GH3	1	-	1	1	1	1	1
	α -glicuronidase	GH67/CBM35	1	1	1	1	1	1	1
	Proteína de função desconhecida	GH115	1	1	1	1	1	1	1
		CE15	1	1	1	1	1	1	1
CE16/CBM1		4	-	-	2	4	4	2	
CE3		-	-	1	-	-	-	-	
Manana	Manosil-oligossacarídeo- α -1,2-manosidase	GH47	1	1	1	1	1	-	1
	Manana-endo- β -1,4-manosidase	GH5/CBM1	2	2	1	2	2	2	2
	Manana-endo- β -1,4-manosidase	GH26/CBM35	2	1	-	2	2	2	2
	Proteína meioticamente regulada	GH125	1	-	-	1	-	-	-
	β -galactosidase	GH2	3	1	2	3	3	2	1
Xiloglicano e glicanos de cadeia mista	Endo- β -1,4-glicanase específica para xiloglicano	GH12	1	-	-	1	1	1	-
	Provável glicosidase	GH16	3	2	2	2	1	-	-
	Endo- β -1,3-glicano-glicosidase	GH17	1	1	1	-	1	1	1
		GH55	1	1	1	1	1	-	1
	α -fucosidase	GH95	1	-	1	1	-	-	-

Tabela 3.4. Outras enzimas identificadas nos secretomas de *Clonostachys byssicola* cultivado em diversas fontes de carbono lignocelulósicas.

Classe	Família CAZy	AV	CMC	X	SB	SJ	EN	BG
Catalase/peroxidase	AA2	1	-	1	1	1	1	-
Álcool oxidase	AA3	1	1	-	1	1	1	1
Proteína de função desconhecida	AA7	1	1	3	1	1	2	1
Glicoamilase	GH15	1	1	1	-	-	-	-
Quitinase	GH18	1	-	2	-	-	1	-
β -hexosaminidase	GH20	-	-	1	-	-	-	-
Proteína de função desconhecida	GH75	-	-	1	-	-	-	-
Proteína de função desconhecida	CE4	2	-	1	2	2	-	1
Cutinase	CE5	2	-	1	1	2	1	1
Carboxilesterase	CE10	1	-	1	1	1	1	1
Lipase	CE10	1	1	1	1	1	1	-
Endo- β -1,4-xilanase	CE10	1	-	1	1	1	1	1
Dipeptidil-peptidase	CE10	1	-	-	1	1	1	-
CBM1/CBM61	CBM	1	1	-	1	1	1	1
CBM48	CBM	-	-	1	-	-	-	-

O isolado de *C. byssicola* produziu um conjunto diverso de enzimas pectinolíticas (Tabela 3.2) quando cultivado nas fontes de carbono utilizadas nesse trabalho. Observa-se que os secretomas obtidos pelo cultivo do fungo em Avicel e em todos os resíduos lignocelulósicos apresentam uma diversidade maior de enzimas relacionadas à degradação da pectina quando comparados aos secretomas induzidos por CMC e xilana. Esse sistema pectinolítico é composto por glicosil hidrolases, polissacarídeo liases e esterases de carboidrato. Endo- e exopoligalacturonases, ambas pertencentes à família GH 28, foram identificadas em todos os secretomas, à exceção das amostras de CMC e xilana. Já as enzimas da família PL1, que atuam na degradação da pectina catalisando reações de β -eliminação, apresentaram uma distribuição mais uniformes entre todos os secretomas avaliados. Também foram identificadas liases das famílias 3, 4 e 9 que, seguindo uma distribuição semelhante às hidrolases da família GH 28, foram identificadas nos secretomas de Avicel e dos resíduos lignocelulósicos. Além dessas enzimas, que atuam principalmente na cadeia principal dos domínios que constituem a estrutura da pectina, outras enzimas que atuam na remoção dos substituintes laterais também foram identificadas nos secretomas avaliados. Arabinogalactana-endo-1,4- β -galactanase (GH 53), endo- β -1,6-galactanase (GH 30) e ramnogalacturonana-acetilesterase apresentaram distribuição semelhante entre as amostras (Tabela 3.2).

Várias enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose foram identificadas nos secretomas produzidos por *C. byssicola*, e são apresentadas na Tabela 3.3. Endo-xilanases pertencentes às famílias GH 10 e GH 11 foram detectadas em todos os secretomas avaliados, evidenciando a importância da degradação da xilana para o crescimento fúngico. Outras enzimas relacionadas à degradação de substituintes laterais também foram detectadas. Acetil-xilana esterases das famílias CE 1 e CE 5 foram identificadas e apresentaram distribuição uniforme em todos os secretomas avaliados. Uma grande diversidade de α -L-arabinofuranosidasas foi identificada, e essas enzimas foram associadas às famílias GH 43, GH 54 e GH 62. A distribuição dessas enzimas entre os secretomas apresentou variações, mas as enzimas foram identificadas principalmente nos secretomas de Avicel e sabugo de milho (Tabela 3.3).

Também foram identificadas feruloil-esterases (CE 1) e α -glicuronidasas (GH 67 e GH 115), sendo que estas últimas enzimas foram identificadas em todos os secretomas.

Além das xilanases, também foram identificadas enzimas cujo substrato corresponde a polissacarídeos constituintes de outras frações da hemicelulose, como hidrolases envolvidas na degradação de xiloglicanos e glicanos de cadeia mista, classificadas nas famílias GH 12, 16, 17, 55 e 95 (Tabela 3.3). Foram identificadas mananases (família GH 26) e β -manosidasas (GH 5) distribuídas nos secretomas. Curiosamente, algumas enzimas envolvidas na degradação de ligações do tipo α entre resíduos de manose foram identificadas, como a manosil-oligossacarídeo- α -1,2-manosidase (GH 47), e uma proteína classificada na família GH 125, que abriga exo- α -1,6-manosidasas (Tabela A.1). No entanto, os polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal apresentam, predominantemente, ligações do tipo β em sua estrutura. Tais enzimas podem estar envolvidas em outros processos fisiológicos do fungo. As α -mananases são responsáveis por promover alterações pós-secretórias em proteínas glicosiladas, conforme foi observado em secretomas de *T. reesei* (Eneyskaya et al., 1998).

Outras enzimas não-relacionadas diretamente à degradação da holocelulose, ou que apresentam função desconhecida também foram identificadas nos secretomas produzidos por *C. byssicola*, e são listadas na Tabela 3.4. Enzimas oxidativas pertencentes às famílias AA2 e AA3 foram detectadas em amostras de diversos secretomas. Estas enzimas, identificadas como catalase/peroxidase e álcool oxidase, respectivamente, estão envolvidas na degradação de lignina. Além disso, uma oxidase da família AA7, relacionada com a degradação de glicooligossacarídeos ou quitooligossacarídeos (Tabela A.1) também está presente em todas as amostras avaliadas. Uma amilase (GH 15) foi identificada exclusivamente nos secretomas obtidos a partir das fontes de carbono industriais. Houve também a presença de cutinases em todos os secretomas, à exceção de CMC. Esta enzima é importante para garantir o acesso das demais enzimas à porção interna da lignocelulose, visto que a cutina corresponde a uma camada cerosa que reveste a superfície dos tecidos vegetais (Pollard et al., 2008), impedindo o acesso das enzimas às frações polissacarídicas do tecido vegetal. Um grupo de enzimas pertencente à família

CE 10 foi identificado, com distribuição uniforme pela maioria dos secretomas (Tabela 3.4.) A família CE 10 foi abolida do CAZy, por conter enzimas que atuam em outros substratos além dos carboidratos. Entre as enzimas pertencentes a esse grupo, destaca-se a presença de uma lipase em todos os secretomas, à exceção do secretoma induzido pelo bagaço de cana.

Algumas enzimas relacionadas à degradação de quitina (famílias GH 18, GH 20, GH 75 e CE 4) também foram identificadas, principalmente nos secretomas de xilana. Quitinases também foram identificadas nos secretomas de *Trichoderma harzianum* (Gómez-Mendoza et al., 2014; Vale et al., 2012), mesmo quando o fungo foi crescido em substratos desprovidos de quitina, como a celulose. As quitinases podem apresentar diversas funções fisiológicas durante o crescimento do fungo. Pelo fato de *C. byssicola* ser uma espécie de hábitos de micoparasitismo, é de se esperar que este fungo produza algumas quitinases constitutivamente. Além disso, estas enzimas podem ser produzidas com o intuito de reciclagem de micélios antigos, permitindo que nutrientes sejam utilizados para a expansão de nova massa micelial (Saykhedkar et al., 2012).

A distribuição do número de proteínas identificadas nos secretomas analisados de *C. byssicola* em função das famílias de carboidrases descritas no CAZy é apresentado na Tabela 3.5. Foram identificadas 54 famílias de enzimas envolvidas na degradação de carboidratos, sendo que a maioria das famílias não foi identificada em todos os secretomas. Esse perfil de distribuição evidencia a especialização do secretoma produzido pelo fungo em função da biomassa na qual está sendo cultivado. O maior número de carboidrases foi identificado nos secretomas de Avicel e sabugo de milho, sendo detectadas 131 e 110 enzimas, respectivamente. Já os secretomas obtidos em xilana e CMC apresentaram os menores números de enzimas ativas contra carboidratos (60 e 61, respectivamente).

Tabela 3.5. Representação esquemática do número de proteínas classificadas em famílias do CAZy identificadas em cada um dos secretomas de *Clonostachyas byssicola*. O número de proteínas relaciona-se à coloração da célula, sendo a escala crescente representada por tons de verde a vermelho.

Família	Avicel	CMC	Xilana	Sabugo	Casca de soja	Engaço	Bagaço
AA 2	1	0	1	1	1	1	0
AA 3	1	1	0	1	1	1	1
AA 7	1	1	3	1	1	2	1
AA 8	2	1	0	2	2	2	1
AA 9	13	9	2	12	10	9	10
CBM1/CBM61	1	1	0	1	1	1	1
CBM 48	0	0	1	0	0	0	0
CE 1	4	2	2	4	4	4	2
CE 10	4	1	3	4	4	4	2
CE 12	4	2	0	4	4	4	3
CE 15	1	1	1	1	1	1	1
CE 16	4	0	0	2	4	4	2
CE 3	0	0	1	0	0	0	0
CE 4	2	0	2	2	2	0	1
CE 5	2	1	1	1	2	2	1
CE 8	1	0	0	0	1	0	1
GH 1	0	0	1	0	0	0	0
GH 2	3	1	2	3	3	2	1
GH 3	5	2	3	4	2	4	2
GH 5	7	6	3	7	7	7	7
GH 6	3	2	0	2	2	3	1
GH 7	4	4	1	4	4	4	4
GH 10	5	4	4	5	5	5	5
GH 11	2	2	2	2	2	2	2
GH 12	1	0	0	1	1	1	0
GH 15	1	1	1	0	0	0	0
GH 16	3	2	3	2	2	0	0
GH 17	1	1	1	0	1	1	1
GH 18	1	0	2	0	0	1	0
GH 20	0	0	1	0	0	0	0
GH 26	2	1	0	2	2	2	2
GH 27	0	0	1	0	0	0	0
GH 28	3	0	0	3	2	3	3
GH 30	2	2	1	2	2	2	2
GH 31	2	1	2	2	2	0	0
GH 33	1	0	0	1	1	0	0
GH 43	7	0	4	6	5	4	2
GH 45	1	1	0	1	1	1	1
GH 47	1	1	1	1	1	0	1
GH 53	1	1	0	1	1	1	1
GH 54	2	0	0	2	0	0	0
GH 55	1	1	1	1	1	0	1

GH 62	1	0	0	1	1	1	0
GH 67	1	1	1	1	1	1	1
GH 72	4	2	4	2	1	1	3
GH 75	0	0	1	0	0	0	0
GH 78	1	0	0	1	0	0	0
GH 93	2	0	0	1	2	0	0
GH 95	1	0	1	1	0	0	0
GH 105	1	0	0	1	1	1	0
GH 115	1	1	1	1	1	1	1
GH 125	1	0	0	1	0	0	0
GH 131	1	1	0	1	1	1	1
PL 1	7	2	1	3	2	6	3
PL 3	6	1	0	5	4	6	2
PL 4	3	0	0	2	2	3	1
PL 9	1	0	0	1	1	1	1
Total	131	61	60	110	102	99	76

A família AA9, que abriga as LPMOs envolvidas na degradação oxidativa da celulose, foi a família com maior número de proteínas presentes em todos os secretomas, à exceção do secretoma de xilana. O maior número de proteínas da família AA 9 foi observado nos secretomas de Avicel e sabugo (13 e 12, respectivamente). Outras famílias de enzimas celulolíticas também apresentaram o mesmo perfil de distribuição, como GH 5 e GH 7. É esperado que o secretoma de xilana contenha um menor número de enzimas celulolíticas, uma vez que não havia celulose disponível no meio de cultura para a assimilação pelo fungo.

Algumas enzimas relacionadas à degradação de xilana também foram identificadas em grande número entre os secretomas. É o caso da família GH 10, composta por xilanases, que apresentou número de proteínas semelhante entre os secretomas. Ainda, a família GH 43, que abriga sacaridasas que atuam na remoção de substituintes laterais em xilana e pectina (como arabinofuranosidasas e arabinanases – Tabela A.2), foi identificada em número considerável em cinco dos sete secretomas avaliados, estando ausentes em secretomas de CMC e em menor quantidade nos secretomas de bagaço de cana-de-açúcar. Por fim, as liases de polissacarídeo, em especial das famílias PL 1 e PL 3, foram representadas por proteínas em números consideráveis nos secretomas de Avicel, sabugo de milho, casca do grão da soja e engaço de bananeira.

Pela análise dos dados mostrados na Tabela 3.5, verifica-se que os secretomas mais diversos, no que se refere a número de proteínas e diversidade de famílias CAZy identificadas, foram produzidos em cultivos onde as fontes de carbono indutoras correspondiam à Avicel, ou aos resíduos lignocelulósicos. O secretoma de Avicel apresentou o maior número de proteínas, e das 54 famílias do CAZy identificadas nos secretomas de *C. byssicola*, apenas 6 não estavam representadas nesse secretoma. Curiosamente, essas seis famílias ausentes em Avicel foram detectadas exclusivamente no secretoma de xilana: um CBM da família 48 e enzimas classificadas nas famílias CE 3, GH 1, GH 20, GH 27 e GH 75.

Além da abordagem qualitativa, os secretomas de *C. byssicola* foram avaliados quantitativamente, através de análise *Label Free*. A tabela A.3 apresenta os dados de abundância normalizada para todas as proteínas comuns às condições. Dentre estas proteínas que apresentaram abundância diferencial em pelo menos uma das condições ($p < 0,05$), algumas carboidrases foram identificadas. A variação das abundâncias dessas enzimas é ilustrada, simplificada, na Tabela 3.6 (quando os secretomas foram comparados ao de Avicel) e na Tabela 3.7 (quando os secretomas foram comparados ao secretoma de xilana de aveia).

Tanto na comparação com o secretoma de Avicel, quanto na comparação com o secretoma de xilana, foi possível estabelecer dois grandes grupos de enzimas que apresentaram maior ou menor abundância em comparação aos dois substratos comerciais utilizados como referência. Algumas enzimas apresentam comportamento semelhante entre os secretomas. É o caso de endoglicanases (GH 5), e de uma pectato liase (PL 1). Estas duas enzimas apresentaram maior abundância nas duas fontes de carbono comerciais em comparação aos resíduos agrícolas. Por outro lado, algumas das esterases de carboidrato identificadas, como as proteínas das famílias CE 8, CE 10 e CE 12 foram identificadas com maior abundância nos resíduos agrícolas. Esta observação é condizente com o fato de que estes resíduos apresentam uma maior diversidade de substituintes laterais, o que justifica a maior presença dessas enzimas nos secretomas induzidos. As diferenças de abundância dessas proteínas complementam a descrição da distribuição qualitativa das proteínas

nos secretomas (Tabelas 3.1-3.4) e confirmam que *C. byssicola* é capaz de ajustar a presença e abundância dos componentes de seu secretoma para a utilização das mais distintas fontes de carbono.

Tabela 3.6. Abundância das carboidrases presentes nos diversos secretomas. A análise estatística foi feita em comparação ao secretoma de Avicel. As setas para baixo indicam abundância significativamente maior no secretoma de Avicel, enquanto que as setas para cima indicam abundância significativamente maior no secretoma comparado ($p < 0,05$).

ID	Proteína	Classe	CMC	X	SB	SJ	EM	BG
BN869_T00007653_1	Similar to plyB Probable pectate lyase B (<i>Aspergillus oryzae</i>)	PL1	↓	↑		↓		
BN869_T00006860_1	Similar to manC Probable mannan endo-1 4-beta-mannosidase C (<i>Aspergillus terreus</i>)	GH5	↓	↓	↓			↓
BN869_T00002256_1	Similar to xlnC Endo-1 4-beta-xylanase C (<i>Neosartorya fumigata</i>)	GH10	↓	↓	↓	↓	↓	↓
BN869_T00010084_1	Similar to abfB Probable alpha-N-arabinofuranosidase B (<i>Aspergillus clavatus</i>)	GH54	↓	↓	↓			↓
BN869_T00012955_1	Similar to plyF Probable pectate lyase F (<i>Emericella nidulans</i>)	PL3		↓	↓	↓		
BN869_T00008730_1	Similar to gel4 1_3-beta-glucanosyltransferase gel4 (<i>Neosartorya fumigata</i>)	GH72/CBM43			↓	↓	↓	↓
BN869_T00007939_1	Similar to rha1 Rhamnogalacturonan acetyltransferase (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	CE12					↓	
BN869_T00006249_1	Protein of unknown function	GH75		↑	↑	↑		
BN869_T00002519_1	Protein of unknown function	GH93		↑			↑	
BN869_T00008857_1	Similar to crf1 Probable glycosidase crf1 (<i>Neosartorya fumigata</i>)	GH16		↑				
BN869_T00007036_1	Protein of unknown function	GT1			↑			↓
BN869_T00011563_1	Similar to UTH1 Protein UTH1	GH132				↑		
BN869_T00007127_1	Similar to pme1 Pectinesterase (<i>Aspergillus tubingensis</i>)	CE8				↑		
BN869_T00008942_1	Similar to LIP1 Lipase 1 (<i>Candida rugosa</i>)	CE10					↑	
BN869_T00000392_1	Similar to egID Probable endo-beta-1,4-glucanase D	AA9					↑	

Tabela 3.7. Abundância das carboidrases presentes nos diversos secretomas. A análise estatística foi feita em comparação ao secretoma de xilana de aveia. As setas para baixo indicam abundância significativamente maior no secretoma de Avicel, enquanto que as setas para cima indicam abundância significativamente maior no secretoma comparado ($p < 0,05$).

ID	Proteína	CAzy	CMC	SB	SJ	EN	BG
BN869_T00007653_1	Similar to plyB Probable pectate lyase B (<i>Aspergillus oryzae</i>)	PL1	↓	↓	↓		↓
BN869_T00008118_1	Similar to eglA Endo-beta-1,4-glucanase A (<i>Emericella nidulans</i>)	GH5	↓	↓			
BN869_T00002519_1	Protein of unknown function	GH93	↓				
BN869_T00008857_1	Similar to crf1 Probable glycosidase crf1 (<i>Neosartorya fumigata</i>)	GH16	↓	↓	↓	↓	
BN869_T00007663_1	Similar to celB Endoglucanase B (<i>Paenibacillus lautus</i>)	GH5/CB M1/46			↓		
BN869_T00006249_1	Protein of unknown function	GH75				↓	
BN869_T00012169_1	Similar to cel1 Cellulose-growth-specific protein (<i>Agaricus bisporus</i>)	AA9				↓	↓
BN869_T00007939_1	Similar to rha1 Rhamnogalacturonan acetylerase (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	CE12				↓	
BN869_T00006915_1	Similar to plyB Probable pectate lyase B (<i>Aspergillus oryzae</i>)	PL1	↑				
BN869_T00006107_1	Similar to gel2 1 3-beta-glucanosyltransferase gel2 (<i>Neosartorya fumigata</i>)	GH72	↓	↑	↑		↑
BN869_T00011563_1	Similar to UTH1 Protein UTH1	GH132		↑			
BN869_T00008942_1	Similar to LIP1 Lipase 1 (<i>Candida rugosa</i>)	CE10		↑		↑	
BN869_T00007127_1	Similar to pme1 Pectinesterase (<i>Aspergillus tubingensis</i>)	CE8		↑	↑	↓	
BN869_T00000392_1	Similar to eglD Probable endo-beta-1,4-glucanase D	AA9		↑			
BN869_T00006860_1	Similar to manC Probable mannan endo-1 4-beta-mannosidase C (<i>Aspergillus terreus</i>)	GH5				↑	
BN869_T00012955_1	Similar to plyF Probable pectate lyase F (<i>Emericella nidulans</i>)	PL3				↑	
BN869_T00012951_1	Protein of unknown function	CE12				↑	

Potencial dos secretomas para hidrólise de biomassa

O isolado de *C. byssicola* foi crescido, durante 7 dias, em meio mínimo suplementado com fontes de carbono lignocelulósicas: sabugo de milho, engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar e casca do grão de soja. O perfil enzimático dos secretomas obtidos após estes cultivos é apresentado na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Perfil enzimático dos secretomas de *Clonostachys byssicola* obtidos sob indução em fontes de carbono lignocelulósicas. Os valores de atividades (em U.I/mL) estão acompanhados dos respectivos desvios-padrões.

Atividade	Sabugo	Engaço	Bagaço	Soja
Mananase	0,30±0,02	0,33±0,02	0,24±0,01	0,41±0,01
Xilanase	1,10±0,03	0,90±0,05	0,95±0,09	0,64±0,05
CMCase	0,49±0,01	0,47±0,01	0,49±0,01	0,42±0,04
Pectinase	0,30±0,05	0,42±0,05	0,14±0,03	0,48±0,07
β-glicosidase	0,17±0,01	N.D	0,12±0,00	0,25±0,02
α-arabinofuranosidase	0,15±0,00	N.D	N.D	0,10±0,01
β-xilosidase	N.D	N.D	N.D	N.D
β-galactosidase	N.D	N.D	N.D	0,12±0,00
β-manosidase	N.D	N.D	N.D	N.D
Proteína Total (mg/mL)	0,16±0,01	0,12±0,00	0,11±0,00	0,23±0,00

N.D: não detectado

A partir do perfil enzimático ilustrado na Tabela 3.8, verifica-se que os níveis de atividade enzimática refletiram a composição típica da holocelulose dos resíduos agrícolas utilizados como indutores dos secretomas. Esta observação fica bem clara quando se compara os níveis de atividades hemicelulolíticas entre os secretomas. Os maiores níveis de mananase, β-glicosidase e β-galactosidase foram observados no secretoma de casca de soja, um resíduo reconhecido pelo elevado teor de manana em sua parede celular (Odetallah et al., 1997). Além disso, os maiores níveis de atividade de xilanase foram observados nos resíduos provenientes de gramíneas (milho e cana-de-açúcar), visto que a arabinoxilana é a hemicelulose predominante na parede celular dessas espécies (Scheller and Ulvskov, 2010).

Composição das biomassas lignocelulósicas submetidas à sacarificação

A composição das amostras de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento alcalino com hidróxido de amônio é apresentado na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Composição química do sabugo de milho e do bagaço de cana antes e após o pré-tratamento com hidróxido de amônio. Todos os valores representam percentuais (%).

Fração	SB	SB Tratado	BG	BG Tratado
Glicano	35,64±0,35	44,37±0,41	43,45±1,80	49,28±0,62
Xilana	23,17±0,35	27,59±0,61	22,11±1,03	23,66±0,48
Galactana	3,51±0,07	2,37±0,08	0,29±0,02	0,21±0,00
Arabinana	9,06±0,10	6,18±0,13	1,26±0,05	1,64±0,03
Holocelulose Total	71,38	80,52	67,12	74,80
ASL	2,46±0,10	1,29±0,06	4,88±0,08	4,87±0,08
AIL	11,32±0,11	6,44±0,72	19,14±0,74	9,07±0,90
Lignina Total	13,79	7,74	24,03	13,94
Cinzas	0,17±0,00	0,27±0,06	1,56±0,20	0,70±0,09
Total	85,33	88,52	92,70	89,44

ASL: Lignina ácido-solúvel

AIL: Lignina ácido-insolúvel

A partir da análise dos dados apresentados, verifica-se que o pré-tratamento alcalino promoveu a delignificação parcial dos resíduos. A delignificação é o principal efeito do pré-tratamento alcalino. Além de permitir a eficiente remoção da lignina, o pré-tratamento alcalino favorece a remoção de substituintes laterais da hemicelulose, como resíduos acetil e de ácidos urônicos, favorecendo a ação das hemicelulases que atuam na cadeia principal das hemiceluloses (Chaturvedi and Verma, 2013). Houve uma redução de cerca de 50% no teor de lignina total do sabugo de milho e do bagaço de cana após o pré-tratamento. Quando se compara o teor de lignina dos dois resíduos após o pré-tratamento, verifica-se que o bagaço apresenta quase o dobro de lignina que o sabugo, sendo este último um resíduo de mais fácil digestão, pelo menos quando se considera o teor de lignina. É provável que um pré-tratamento mais longo permitiria a maior delignificação do bagaço. Beukes and Pletschke, (2011) reportaram um decréscimo de lignina de 42% para 8% após o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de amônia a 70°C por 36 horas.

Pelos dados apresentados na Tabela 3.9, observa-se que houve um acréscimo na proporção de glicana e xilana após o pré-tratamento, um reflexo da remoção de parte da lignina. Ainda, a proporção glicana:xilana permaneceu praticamente estável quando os resíduos são comparados antes e após o pré-tratamento. Esse resultado evidencia que, juntamente com a remoção de parte da lignina, não houve perda considerável da fração hemicelulósica. Foram observadas perdas de parte das frações de arabinana e galactana durante o pré-

tratamento do sabugo de milho. No entanto, houve um pequeno acréscimo no teor de arabinana do bagaço após o tratamento. Resultado semelhante também foi reportado por Beukes and Pletschke, (2011).

Hidrólise enzimática

A sacarificação do sabugo de milho e do bagaço de cana-de-açúcar parcialmente delignificados foi realizada utilizando secretomas de *C. byssicola* obtidos a partir do cultivo do fungo em sabugo de milho, engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar e casca do grão da soja. O perfil de liberação de açúcares redutores totais ao longo do processo de sacarificação é apresentado na Figura 3.4. Pela análise dos dados, verifica-se que o sabugo de milho (Fig. 3.4 (a)) se mostrou um substrato mais hidrolisável ($p < 0,05$) que o bagaço (Fig. 3.4 (b)), considerando os quatro secretomas utilizados na sacarificação, uma vez que foi verificada uma diferença na concentração de açúcares redutores totais liberados em função da sacarificação dos dois resíduos. Conforme mencionado anteriormente, é possível que essa diferença seja explicada pela diferença nos teores de lignina entre os dois substratos, uma vez que a lignina remanescente no bagaço após o pré-tratamento é quase o dobro do teor de lignina aferido para o sabugo pré-tratado nas mesmas condições.

O quatro secretomas utilizados apresentaram performance semelhante ($p < 0,05$) na sacarificação do sabugo de milho, com o secretoma de sabugo apresentando tendência de liberação de açúcares redutores totais ligeiramente superior aos demais secretomas. Esse perfil também é observado na hidrólise do bagaço de cana. Entretanto, quando a hidrólise do bagaço de cana foi efetuada utilizando-se o secretoma obtido em casca do grão de soja, a concentração de açúcares redutores totais foi consideravelmente menor em comparação à sacarificação executada com os demais secretomas ($p < 0,05$). Essa liberação menor provavelmente foi resultado da menor atividade específica observada para o secretoma de soja (Tabela 3.8), uma vez que a quantidade de secretoma utilizado na sacarificação foi padronizada em função da quantidade de proteína total (1 mg/g de biomassa).

É possível observar duas fases distintas na liberação de açúcares redutores totais decorrente da sacarificação das duas biomassas lignocelulósicas empregadas nesse trabalho. A concentração total de açúcares

aumenta de forma linear nos dois primeiros dias de sacarificação, e posteriormente, há um incremento pequeno, ou até mesmo uma tendência de estabilização na concentração de açúcares (Fig. 3.4 (a) e (b)). Esta inflexão, observada a partir do segundo dia, pode ser atribuída à inibição enzimática em decorrência do acúmulo de açúcares no meio de sacarificação. Uma outra possibilidade a ser abordada seria a desnaturação das enzimas presentes nos secretomas, mas os dados de termoestabilidade, apresentados na Figura 3.3, indicam que não houve redução considerável nos níveis de xilanase e CMCase monitorados durante os 7 dias de sacarificação.

O teor de pentoses totais liberadas ao longo da sacarificação é apresentado na Figura 3.4. Observa-se que o perfil de liberação de açúcares redutores totais e pentoses apresenta semelhanças. Houve diferenças consideráveis ($p < 0,05$), da ordem de três vezes, entre a quantidade de pentoses liberadas durante a sacarificação do sabugo de milho (Fig. 3.4 (c)), quando comparada à hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (Fig. 3.4 (d)). A liberação de pentoses seguiu uma tendência similar à observada para a concentração de açúcares redutores totais, sendo maior no período inicial de hidrólise (até o primeiro dia para o sabugo, e até o segundo dia para o bagaço).

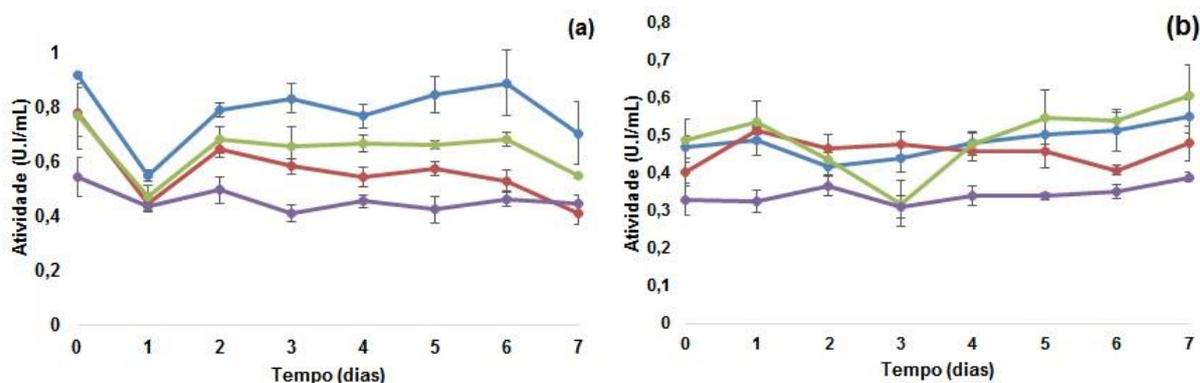


Figura 3.3 Termoestabilidade das atividades de xilanase (a) e CMCase (b) monitoradas durante a sacarificação. Legenda: sabugo (—●—), engaço (—●—), bagaço (—●—) e casca de soja (—●—).

O teor de pentoses liberadas pela sacarificação do sabugo de milho com o secretoma obtido em casca de soja apresentou-se consideravelmente menor quando comparado aos demais secretomas ($p < 0,05$). Conforme mencionado anteriormente, a dose de enzimas utilizada nos experimentos de sacarificação foi padronizada a partir da quantidade total de proteínas do secretoma. Como é

possível inferir pela Tabela 3.8, o secretoma obtido em casca de soja apresenta a maior concentração de proteínas, mas atividades de xilanase e celulase consideravelmente mais baixas. Dessa forma, as atividades específicas no secretoma de casca de soja são consideravelmente menores quando comparadas às atividades dos demais secretomas, o que justifica a liberação de uma concentração menor de açúcares redutores, pentoses totais e glicose observados, em especial, nos resultados de sacarificação do sabugo de milho.

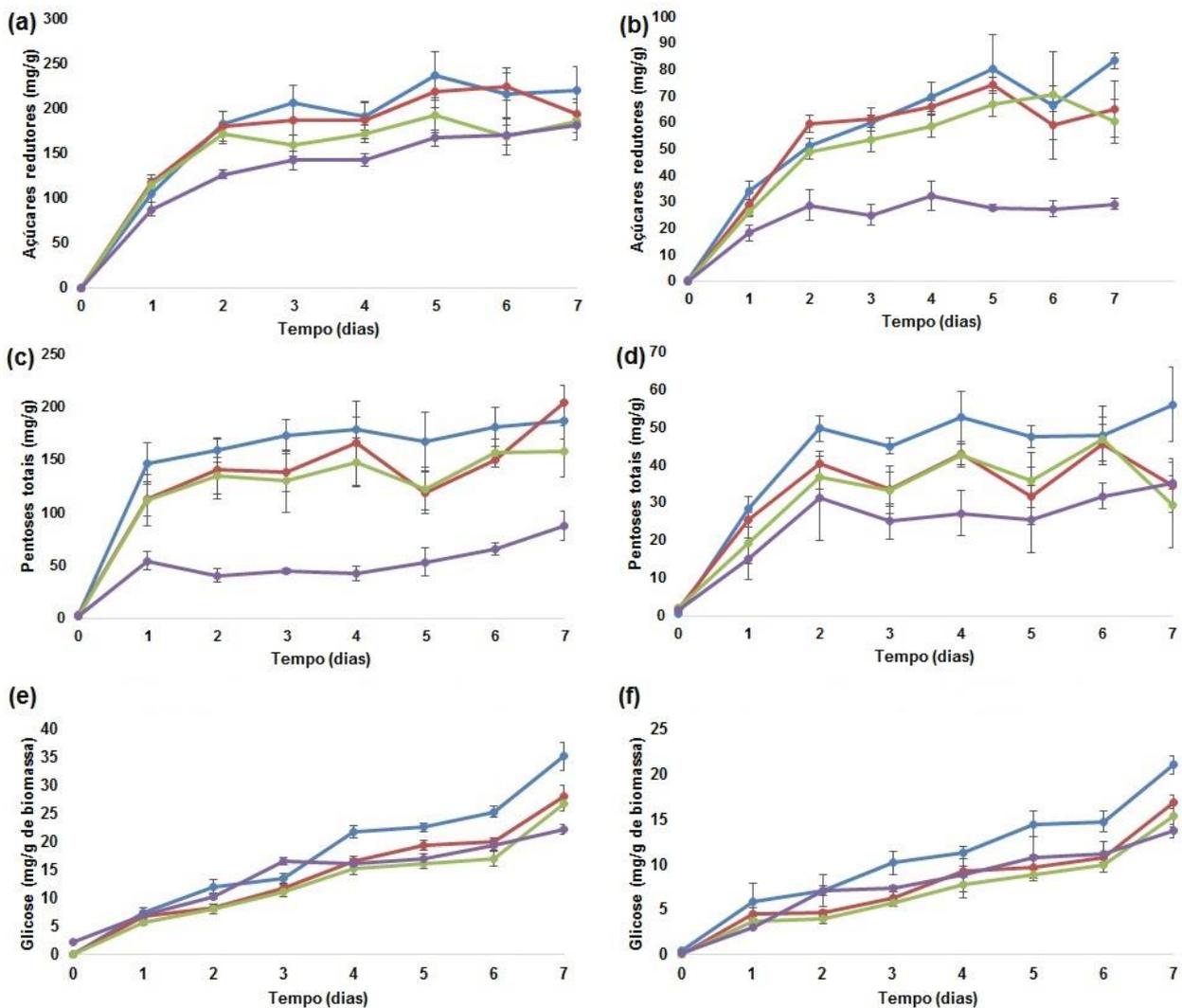


Figura 3.4. Monitoramento dos produtos liberados durante a sacarificação de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. Os valores são apresentados acompanhados das respectivas barras de desvio-padrão. (a) e (b): açúcares redutores totais liberados durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente; (c) e (d): pentoses totais determinadas durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente. (e) e (f): teor de glicose monitorado durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente. Legenda: sabugo (—), engaço (—), bagaço (—) e casca de soja (—).

Ao contrário dos resultados observados para os teores de açúcares redutores e pentoses totais, que apresentam tendência de estabilização a partir do segundo dia, os teores de glicose aferidos apresentam contínuo acréscimo durante todo o período de sacarificação. Foram detectados valores de concentração de glicose maiores resultantes da sacarificação do sabugo (Fig. 3.3 (e)) em comparação com a sacarificação do bagaço ($p < 0,05$) (Fig. 3.3 (f)), independente do secretoma utilizado.

A liberação mais lenta da glicose observada nos experimentos de sacarificação é atribuída à própria estrutura recalcitrante da celulose. Além disso, espera-se que nos primeiros dias de sacarificação a quantidade de glicose liberada seja pequena, e que as concentrações desse açúcar aumentem ao longo da sacarificação uma vez que a remoção da hemicelulose, observada a partir da liberação de pentoses, permita uma maior exposição da fração celulósica, e por consequência o maior acesso das celulasas ao seu substrato.

Os produtos de hidrólise também foram identificados por meio de cromatografia em HPLC-PAD. Os resultados são apresentados na Figura 3.5. Os principais produtos de degradação detectados nas amostras coletadas durante a sacarificação das biomassas lignocelulósicas foram glicose, celobiose, xilobiose e manose. Destaca-se que o produto predominante foi a xilobiose (Fig. 3.5 (e) e (f)). As diferenças nas concentrações de açúcares redutores totais, pentoses e glicose observadas entre as amostras da sacarificação do sabugo e do bagaço observados na Figura 3.3 também foram observadas durante a análise dos produtos de hidrólise por meio de cromatografia líquida (Figura 3.5), reforçando o fato de que, nas condições utilizadas neste trabalho, o sabugo de milho se mostrou uma biomassa mais facilmente hidrolisável em comparação ao bagaço de cana.

A mesma tendência de aumento das concentrações de glicose no período mais tardio da sacarificação também foi observada para as concentrações de glicose (Fig. 3.5 (a) e (b)) e celobiose (Fig. 3.5 (c) e (d)) medidas em HPLC. Foram observadas concentrações crescentes de manose, tanto para a sacarificação do sabugo (Fig. 3.5 (g)), quanto para a do bagaço (Fig. 3.5 (h)). A tendência de liberação de manose apresentou-se bastante semelhante à liberação de glicose e celobiose, para ambos os resíduos avaliados.

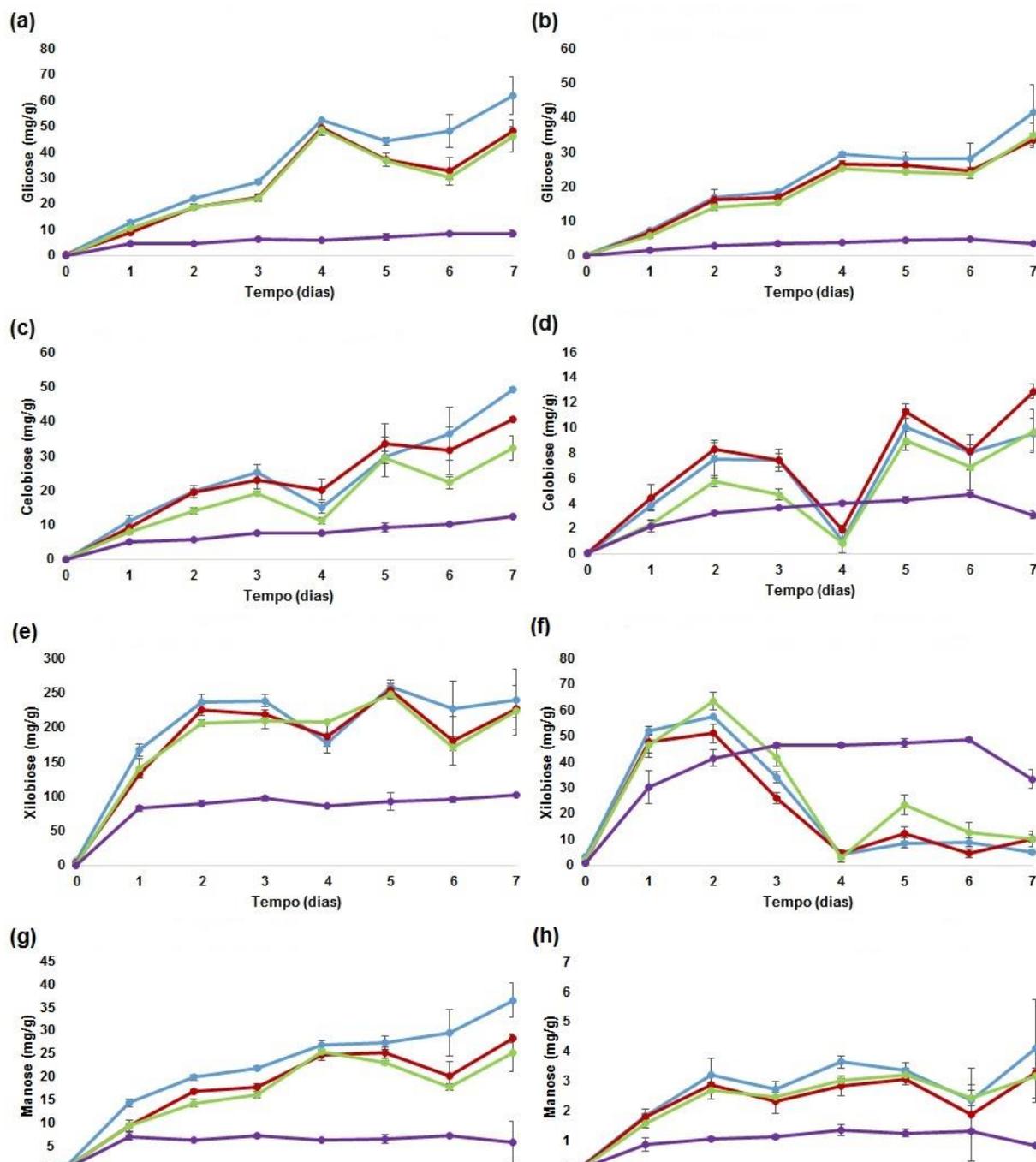


Figura 3.5. Concentração dos principais produtos de hidrólise detectados durante a sacarificação do sabugo de milho e do bagaço de cana-de-açúcar, determinada por meio de HPLC-PAD. Os valores são apresentados acompanhados dos respectivos desvios-padrão. (a) e (b): concentrações de glicose detectadas durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente; (c) e (d): evolução das concentrações de celobiose durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente; (e) e (f): concentrações de xilobiose medidas durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente; (g) e (h): concentrações de manose aferidas durante a sacarificação do sabugo e do bagaço, respectivamente. Legenda: sabugo (—●—), engaço (—■—), bagaço (—▲—) e casca de soja (—◆—).

Discussão

Os resíduos agrícolas têm sido intensamente estudados quanto ao seu potencial de uso como indutores de enzimas lignocelulolíticas produzidas por microrganismos saprófitas. Estes resíduos são baratos, e gerados em grandes quantidades anuais em países de atividade agrícola intensa, como é o caso do Brasil. Neste trabalho, foram utilizados resíduos provenientes das principais lavouras cultivadas no país para a indução da secreção de enzimas lignocelulolíticas por *C. byssicola*. No ano de 2016, as três culturas mais expressivas em termos de quantidade colhida foram a cana-de-açúcar (768 milhões de toneladas), soja (96 milhões de toneladas) e milho (64 milhões de toneladas) (IBGE, 2016). As lavouras de banana também apresentaram colheitas consideráveis, com a produção de 6,7 milhões de toneladas da fruta. Esses números dão a dimensão da quantidade de resíduos gerados pelo manejo agrícola e colheita dessas culturas. A incorreta disposição desse material ocasiona impacto ambiental considerável, além de contribuir para a proliferação de pragas. Além disso, a utilização desses resíduos em processos fermentativos com vistas à produção de holocelulases permitiria a obtenção de coquetéis enzimáticos mais baratos (o custo das enzimas representa um entrave à viabilidade econômica de processos industriais que utilizam biomassa lignocelulósica como matéria-prima), além de possibilitar a produção desses coquetéis nas instalações (*in place*) dedicadas à hidrólise e fermentação da lignocelulose.

O isolado de *C. byssicola* produziu um conjunto diverso de enzimas quando cultivado tanto nas fontes de carbono comerciais quanto nos resíduos agrícolas. Diversos estudos têm sido executados com o intuito de compreender e avaliar o potencial de secretomas de fungos filamentosos quando cultivados em resíduos lignocelulósicos. Mahajan and Master, (2010) caracterizaram o secretoma produzido por *Phanerochaete carnosae* induzido por Avicel e resíduos de abeto. O secretoma nas duas fontes de carbono distintas apresentou perfil similar de lignocelulases, e os autores sugeriram que *P. carnosae* poderia se adaptar ao crescimento em substratos tão distintos não pela expressão de enzimas diferentes, mas a partir do ajuste da abundância de certos componentes

de um secretoma constituído, basicamente, pelas mesmas enzimas. Esta mesma estratégia pode ser utilizada por *C. byssicola*, visto que poucas proteínas foram identificadas como exclusivas de uma certa condição (Tabela A.1, Anexo A). No entanto, outros estudos são necessários para verificar esta hipótese.

Neste estudo, foi verificado que o maior número de proteínas foi identificado no secretoma obtido quando *C. byssicola* foi cultivado em Avicel. Este resultado é, no mínimo, intrigante visto que o substrato em questão é estruturalmente muito mais simples que as demais fontes de carbono utilizadas, como xilana e os resíduos agrícolas. Ainda, os maiores níveis de atividades enzimáticas foram observados em cultivos com os resíduos agrícolas como fontes de carbono. Mesmo assim, do total de 310 proteínas identificadas nos secretomas de *C. byssicola*, 204 foram detectadas no secretoma induzido por Avicel. A maior diversidade de enzimas em secretomas induzidos por celulose também tem sido relatada em outros estudos. Gómez-Mendoza et al., (2014) verificaram uma maior diversidade de proteínas quando *Trichoderma harzianum* foi cultivado em CMC, embora os níveis de atividade enzimática tenham sido superiores quando o fungo foi cultivado em bagaço de cana-de-açúcar. Análises do secretoma de *P. carnosus* obtido em Avicel e lascas de abeto evidenciaram um número maior de proteínas identificado na fonte de carbono comercial em comparação ao resíduo lignocelulósico (Mahajan and Master, 2010). A análise do secretoma de *Penicillium oxalicum* revelou que um número maior de enzimas pectinolíticas e quitinolíticas foi produzido sob indução por Avicel (Liao et al., 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho são insuficientes para explicar a maior abundância de proteínas no cultivo com Avicel. É provável que a recalcitrância característica deste substrato, devido à estrutura cristalina ou maior número de ligações de hidrogênio, possa influenciar na diversidade de proteínas do secretoma produzido pelo fungo. Essa hipótese pode ser confirmada quando se compara o secretoma produzido pelo fungo em CMC e xilana. Estas duas fontes de carbono comerciais são, em tese, mais facilmente digeríveis, e no secretoma induzido por esses dois polissacarídeos, a diversidade de carboidrases é bem menor quando comparada aos secretomas obtidos em Avicel ou nos resíduos agrícolas. A recalcitrância característica da

Avicel, em decorrência de sua elevada cristalinidade, poderia levar à uma situação de privação de carbono. Sob essas condições, os fungos filamentosos normalmente expressam um conjunto de enzimas hidrolíticas destinadas a promover o reconhecimento da fonte de carbono, de modo que a expressão possa ser ajustada posteriormente (van Munster et al., 2014). É provável que a grande diversidade de enzimas observadas quando *C. byssicola* foi cultivado em Avicel seja consequência da dificuldade em digerir o substrato, o que poderia induzir a liberação de uma gama maior de enzimas em busca para ampliar a faixa de nutrientes a serem utilizadas pelo fungo.

Os secretomas obtidos em resíduos agrícolas mostraram potencial para aplicação em processos de hidrólise. Os quatro secretomas avaliados na sacarificação de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar parcialmente delignificados possibilitaram a solubilização de parte considerável da xilana presente nos substratos. A partir da identificação dos produtos de hidrólise por HPLC-PAD, verificou-se que a xilobiose foi o produto resultante liberado a partir da degradação da hemicelulose. Nos primeiros dias do experimento de sacarificação, foi detectado um pico de baixa concentração de xilotriose, mas que não foi detectado nos dias posteriores (dados não mostrados), o que indica que a xilotriose foi posteriormente convertida a xilobiose.

O predomínio absoluto de xilobiose como produto de hidrólise da xilana é um indicativo da eficiência do sistema xilanolítico produzido por *C. byssicola* em resposta à diferentes fontes de carbono lignocelulósicas. Pelos dados apresentados na Tabela 3.3, observa-se que o sistema xilanolítico secretado pelo fungo é composto por uma gama de enzimas que atuam na cadeia principal, e também na remoção de substituintes laterais. O sinergismo existente entre estes dois grupos de enzimas é bem relatado na literatura, e a ação cooperativa envolvida na degradação da xilana é determinante sobre o tipo de produto de hidrólise a ser formado (Dodd and Cann, 2009). Os substituintes laterais, em especial os radicais acetil, constituem impedimentos estéricos consideráveis para as enzimas que atuam na cadeia principal, o que ocasiona a liberação de xilooligômeros acetilados de graus variados de condensação (Zhang et al., 2011). Ainda, as interações estabelecidas entre a xilana e a lignina correspondem a consideráveis elementos determinantes da recalcitrância da

lignocelulose. Dessa forma, as enzimas que atuam no rompimento dos complexos lignina-carboidrato, como feruloil-esterases e α -glicuronidasas, são de grande importância para o aumento da digestibilidade da biomassa vegetal. A xilobiose também foi o principal produto de degradação observado durante a degradação de bagaço de cana-de-açúcar empregando endoxilanasas das famílias GH 10 e 11, bem como uma α -L-arabinofuranosidase da família GH 51 (Goldbeck et al., 2014).

Entre as xilanasas produzidas por *C. byssicola* há várias enzimas que atuam na remoção de substituintes laterais (Tabela 3.3). Uma grande diversidade de esterases de carboidratos, classificadas nas famílias CE 1, CE 5, CE 15 e CE 16 foram identificadas nas amostras de secretomas avaliados neste trabalho, especialmente nos secretomas induzidos por Avicel e pelos resíduos agrícolas. Estas enzimas atuam na remoção de resíduos acetil associados à cadeia principal, bem, como na remoção de resíduos de ferulato associados à resíduos de arabinose (Tabela A.2, Anexo A). Ainda, duas α -glicuronidase (GH 67/ CBM 35 e GH 115), e uma 4-O-metilglicuronil metilesterase (CE 15) foram identificadas em todos os secretomas avaliados. As glicuronidasas também são enzimas importantes para a quebra de complexos lignina-carboidrato, uma vez que ligações covalentes também podem ser estabelecidas entre a lignina e resíduos de 4-O-metilglicuronil (Bååth et al., 2016).

Além das enzimas acessórias, *C. byssicola* produziu endoxilanasas classificadas nas famílias GH 10 e GH 11. Em todos os secretomas, essas duas enzimas foram identificadas, sugerindo que a degradação e assimilação da xilana é uma estratégia utilizada pelo fungo quando crescido em fontes de carbono complexas. A importância das enzimas das famílias GH 10 e GH 11 em estudos de sacarificação de biomassa tem sido ressaltada em diversos trabalhos. Inclusive, a especificidade característica dessas enzimas é essencial para garantir a eficiente degradação da xilana. As endo-xilanasas da família GH 10 apresentam preferência por substratos solúveis, e são capazes de atuar na degradação de ligações glicosídicas em resíduos de xilose situados próximos à substituintes laterais. Já as enzimas classificadas na família GH 11 apresentam preferência pela porção insolúvel da xilana, e não são capazes de catalisar o rompimento da ligação glicosídica localizada próximo à substituintes laterais.

Ainda, as endo-xilanases GH 11 apresentam massa molecular menor, o que permite à essas enzimas alcançarem as camadas mais profundas da lignocelulose, favorecendo a desestabilização da estrutura da parede celular (Beaugrand et al., 2004; Goldbeck et al., 2014). Assim, a atuação conjunta das duas enzimas contribui para a melhor eficiência da hidrólise da xilana.

O sistema xilanolítico produzido por *C. byssicola* apresenta composição semelhante à coquetéis de importância comercial, exceto pela ausência de β -xilosidase (Chundawat et al., 2011). O acúmulo de xilobiose observado durante a sacarificação do sabugo de milho (Fig. 3.5 (e)) e do bagaço de cana-de-açúcar (Fig. 3.5 (f)) corrobora a ausência de atividade de β -xilosidase evidenciada na caracterização dos secretomas (Tabela 3.8). Embora algumas proteínas tenham sido identificadas como xilosidases, o mais provável é que estas proteínas tenham sido identificadas erroneamente como tais durante a anotação do genoma. Este mesmo fato também foi observado durante a caracterização do secretoma produzido por *Podospira anserina*, no qual foram detectadas proteínas identificadas como β -xilosidase, apesar da ausência de atividade enzimática contra pNPX (Poidevin et al., 2014).

A identificação do secretoma de *C. byssicola* obtido em resposta à diversas fontes de carbono revelou um conjunto diverso de enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose. Estas enzimas apresentam importância biotecnológica no contexto das biorrefinarias, onde os polissacarídeos da parede celular vegetal devem ser degradados aos seus monômeros, que serão utilizados em processos para a obtenção dos mais variados produtos. Além das holocelulases, outras enzimas de importância biotecnológica também foram identificadas, ampliando a escala de aplicação dos secretomas estudados neste trabalho. Uma lipase foi identificada em todos os secretomas, exceto em bagaço. As lipases apresentam grande importância para a indústria de detergentes, de síntese química, e também para a produção de biodiesel. Quitinases e glicanases, que atuam na degradação da parede celular de fungos, também foram produzidas por *C. byssicola*, e apresentam potencial de utilização em processos de controle biológico.

Conforme já mencionado na seção de Resultados, o acúmulo de xilobiose pode interferir negativamente na atuação de outras enzimas hidrolíticas. Este

dissacarídeo, bem como outros xilooligômeros, apresentam efeito inibitório sobre celulasas e xilanasas (Qing et al., 2010; Zhang and Viikari, 2012). É possível, inclusive, que a estabilização dos níveis de açúcares redutores e pentoses totais a partir do terceiro dia sejam consequência do acúmulo de grande quantidade de xilobiose nesse período. Por outro lado, aparentemente as celulasas produzidas por *C. byssicola* parecem não apresentar inibição nas concentrações de xilobiose detectadas durante a hidrólise, visto que a concentração de glicose e celobiose aumentam a partir do quarto dia e continuam crescentes até o fim do experimento de hidrólise. No entanto, é importante que novos experimentos de hidrólise sejam planejados utilizando os secretomas avaliados neste trabalho, suplementando-os com xilosidases comerciais, com o objetivo de se verificar a influência da xilobiose sobre os níveis de açúcares liberados durante a sacarificação.

Embora os níveis de xilobiose possam ter influência negativa sobre a performance de demais enzimas, o acúmulo deste dissacarídeo durante a hidrólise apresenta o potencial de secretomas de *C. byssicola* como ferramentas interessantes para a obtenção de xilooligossacarídeos a partir de fontes de carbono baratas. O potencial da xilobiose como prebiótico, bem como um adoçante em potencial têm sido descritos (Aachary and Prapulla, 2011). A administração de xilobiose a camundongos se mostrou benéfica ao promover alterações metabólicas importantes para aliviar os sintomas decorrentes do diabetes (Lim et al., 2016). Ainda, a fermentação da xilobiose com vistas à produção de bioetanol também tem sido estudada. Burchhardt and Ingram, (1992) avaliaram a fermentação de xilooligossacarídeos por isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*, e esta última cepa demonstrou boa capacidade de fermentação de xilobiose e produção de etanol.

O perfil liberação de xilobiose, glicose e manose observado durante a sacarificação do sabugo e do bagaço parcialmente delignificados revelam a organização estratificada da holocelulose presente nos resíduos submetidos à sacarificação. Essa mesma organização foi mencionada por Zhang et al., (2011) ao avaliarem a hidrólise de palha de trigo e cana gigante. A liberação da xilobiose já nas etapas iniciais da sacarificação evidencia que a xilana é a porção mais acessível às enzimas, e envolve as microfibrilas de celulose. A liberação de

xilobiose se estabiliza a partir do segundo dia, e do terceiro dia em diante os níveis de glicose, celobiose e manose começam a crescer, e permanecem nessa tendência ao longo de todo o período de sacarificação. Ou seja, após a estabilização da liberação de xilobiose, a concentração dos demais açúcares começa a aumentar, indicando que as enzimas já conseguem acessar a porção celulósica do substrato.

Observa-se que os níveis de glicose, manose e celobiose apresentam tendência similar de crescimento. Este resultado está de acordo com evidências disponíveis na literatura que apontam a existência de uma associação de frações de hemicelulose, como manana, xilana e xiloglicanos, às microfibrilas de celulose (Eronen et al., 2011). Esta associação pode ser intensificada em função de certos tipos de pré-tratamento, e podem constituir impedimento à degradação enzimática da celulose (Wang et al., 2017). Kumar and Wyman, (2014) verificaram que a associação de cadeias de manana à superfície da celulose pode ser intensificada pela presença de substituintes laterais, como resíduos de galactose. A presença de manana na superfície da celulose reduz o número de sítios disponíveis para a ancoragem das celulasas, comprometendo a hidrólise eficiente. Adicionalmente, é possível que as mananas alterem a viscosidade do meio, reduzindo a difusão de enzimas (Kumar and Wyman, 2014).

O efeito sinérgico da atuação conjunta de mananases e celulasas sobre a hidrólise de celulose suplementada com manana tem sido reportado. Wang et al., (2017) verificaram aumento considerável nas taxas de hidrólise de Avicel, previamente misturado com manana, quando celulasas e mananases foram adicionadas conjuntamente. Este resultado demonstra a necessidade da suplementação de coquetéis enzimáticos com mananases, de forma a evitar restrições impostas à ação de celulasas pela deposição de manana na superfície da fração celulósica. Os secretomas produzidos por *C. byssicola* avaliados neste trabalho apresentam enzimas envolvidas na degradação de manana (Tabelas 3.3 e 3.6). A liberação de manose, evidenciada na Figura 3.5 ((g) e (h)), mostra que os secretomas produzidos pelo fungo podem remover a manana associada à celulose, permitindo o acesso das celulasas sobre o seu substrato.

Conclusões

O isolado de *C. byssicola* utilizado nesse trabalho produziu um secretoma diverso quando cultivado em fontes de carbono complexas e distintas. O fungo secretou o maior e mais diverso conjunto de enzimas quando cultivado em Avicel, ainda que os maiores níveis de atividade enzimática tenham sido detectados quando *C. byssicola* foi cultivado em resíduos agrícolas. A caracterização dos secretomas revelou um conjunto diverso de carboidrases, proteases, e outras proteínas relacionadas a funções metabólicas diversas. A avaliação qualitativa e quantitativa de das proteínas que compõem o secretoma de *C. byssicola* revelou que o fungo consegue adaptar o secretoma em função da fonte de carbono disponível, e que estas alterações podem envolver principalmente o ajuste de abundância de certas enzimas, visto que, em termos qualitativos, o secretoma não apresentou grandes variações entre as condições de cultivo, principalmente quando se considera Avicel e os resíduos agrícolas. Os secretomas obtidos em resposta aos resíduos agrícolas apresentou potencial na sacarificação de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar parcialmente delignificados, em especial quando se considera a remoção de hemicelulose. Os resultados obtidos na hidrólise das duas biomassas sugerem que os secretomas de *C. byssicola*, principalmente os cultivados em sabugo, engaço de bananeira, e bagaço, apresentam potencial como fonte de enzimas complementares para os coquetéis celulolíticos comerciais.

Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos a partir da hidrólise de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar revelaram o potencial dos secretomas produzidos por *C. byssicola* como fontes importantes de holocelulases, em especial de hemicelulases, visto que os secretomas solubilizaram uma porção considerável de hemicelulose já nos primeiros dias de hidrólise. A próxima etapa do trabalho terá por objetivo avaliar a performance dos secretomas utilizados neste trabalho como coquetéis suplementares a formulações comerciais de celulases.

Neste trabalho verificou-se que a liberação de celulose ocorreu de forma lenta e gradual, e os níveis de liberação de glicose não se estabilizaram até o sétimo dia de hidrólise. Este resultado provavelmente se deve à baixa carga de proteína total utilizada neste trabalho. Portanto, perspectivas futuras envolverão a concentração dos secretomas, de modo a permitir a utilização de cargas maiores de proteína total, principalmente com o intuito de se empregar uma dose maior de celulases.

Outras estratégias também serão empregadas, visando a melhorar a produção de enzimas por *C. byssicola*. Entre estas estratégias, inclui-se outras formas de cultivo, como fermentação em estado sólido, ou até mesmo a ampliação da escala do cultivo submerso, para fermentador de 2 L. Nesse último caso, seria possível otimizar os parâmetros de forma a favorecer a produção de títulos superiores de atividade enzimática, bem como a obtenção de maiores volumes de extrato bruto.

A sacarificação do sabugo de milho apresentou resultados superiores à do bagaço de cana de açúcar. Foram verificadas diferenças químicas consideráveis entre os dois resíduos após o pré-tratamento com hidróxido de amônio, como o menor conteúdo de lignina e a maior proporção de hemicelulose observados no bagaço. Pelos resultados obtidos, a estrutura do sabugo de milho parece ser mais acessível às enzimas produzidas por *C. byssicola*. Com base nesses resultados, seria interessante avaliar o potencial de sacarificação de outros resíduos gerados nas lavouras de milho, como a palha, que é gerada em quantidades semelhantes às de sabugo.

A grande diversidade de enzimas holocelulolíticas de interesse biotecnológico produzidas por *C. byssicola*, como revelado neste trabalho, permite classificar este fungo como uma nova ferramenta para o desenvolvimento de processos em biorrefinaria. O potencial já estabelecido de espécies do gênero *Clonostachys* para biocontrole. Bem como promoção do crescimento de plantas, permitiria o desenvolvimento de processos com dupla finalidade – produção de enzimas e de bioprodutos para controle biológico.

Referências

- Aachary, A.A., Prapulla, S.G., 2011. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 2–16. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x
- Bååth, J.A., Giummarella, N., Klaubauf, S., Lawoko, M., Olsson, L., 2016. A glucuronoyl esterase from *Acremonium alcalophilum* cleaves native lignin-carbohydrate ester bonds. *FEBS Lett.* 590, 2611–2618. doi:10.1002/1873-3468.12290
- Beaugrand, J., Chambat, G., Wong, V.W.K., Goubet, F., Rémond, C., Paës, G., Benamrouche, S., Debeire, P., O'Donohue, M., Chabbert, B., 2004. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. *Carbohydr. Res.* 339, 2529–2540. doi:10.1016/j.carres.2004.08.012
- Beukes, N., Pletschke, B.I., 2011. Effect of alkaline pre-treatment on enzyme synergy for efficient hemicellulose hydrolysis in sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 102, 5207–5213. doi:10.1016/j.biortech.2011.01.090
- Bouws, H., Wattenberg, A., Zorn, H., 2008. Fungal secretomes - Nature's toolbox for white biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 381–388. doi:10.1007/s00253-008-1572-5
- Burchhardt, G., Ingram, L.O., 1992. Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1128–1133.
- Chandel, A.K., Antunes, F.A., Silva, M.B., da Silva, S.S., 2013. Unraveling the structure of sugarcane bagasse after soaking in concentrated aqueous ammonia (SCAA) and ethanol production by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. *Biotechnol. Biofuels* 6, 102. doi:10.1186/1754-6834-6-102
- Chaplin, M.F., 1986. Monosaccharides, in: Chaplin, M.F., Kennedy, J.F. (Eds.), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 1–36.
- Chaturvedi, V., Verma, P., 2013. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *3 Biotech* 3, 415–431. doi:10.1007/s13205-013-0167-8
- Chundawat, S.P.S., Lipton, M.S., Purvine, S.O., Uppugundla, N., Gao, D., Balan, V., Dale, B.E., 2011. Proteomics-based Compositional Analysis of Complex Cellulase - Hemicellulase Mixtures. *J. Proteome Res.* 10, 4365–4372.
- Dodd, D., Cann, I.K.O., 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy Bioenergy* 1, 2–17. doi:10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x
- Eneyskaya, E. V, Kulminskaya, A.A., Savel'ev, A.N., Shabalin, K.A., Golubev, A.M., Neustroev, K.N., 1998. α -Mannosidase from *Trichoderma reesei* participates in the postsecretory deglycosylation of glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 43–49. doi:10.1006/bbrc.1998.8382

- Eronen, P., Österberg, M., Heikkinen, S., Tenkanen, M., Laine, J., 2011. Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. *Carbohydr. Polym.* 86, 1281–1290. doi:10.1016/j.carbpol.2011.06.031
- Goldbeck, R., Damásio, A.R.L., Gonçalves, T. a., Machado, C.B., Paixão, D. a. a., Wolf, L.D., Mandelli, F., Rocha, G.J.M., Ruller, R., Squina, F.M., 2014. Development of hemicellulolytic enzyme mixtures for plant biomass deconstruction on target biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8513–8525. doi:10.1007/s00253-014-5946-6
- Gomes, H.A.R., Silva, A.J. da, Gómez-Mendoza, D.P., Santos Júnior, A.C.M. dos, Cologna, N. de M. di, Almeida, R.M., Miller, R.N.G., Fontes, W., Sousa, M.V. de, Ricart, C.A.O., Filho, E.X.F., 2017. Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. *J. Biotechnol.* 254, 51–58. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.06.001
- Gómez-Mendoza, D.P., Junqueira, M., Do Vale, L.H.F., Domont, G.B., Ferreira Filho, E.X., Sousa, M.V. De, Ricart, C.A.O., 2014. Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. *J. Proteome Res.* 13, 1810–1822. doi:10.1021/pr400971e
- Gusakov, A. V, 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol.* 29, 419–25. doi:10.1016/j.tibtech.2011.04.004
- Hatfield, R.D., Rancour, D.M., Marita, J.M., 2017. Grass Cell Walls: A Story of Cross-Linking. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.02056
- IBGE, 2016. *Produção Agrícola Municipal*. Rio de Janeiro.
- Karlsson, M., Durling, M.B., Choi, J., Kosawang, C., Lackner, G., Tzelepis, G.D., Nygren, K., Dubey, M.K., Kamou, N., Levasseur, A., Zapparata, A., Wang, J., Amby, D.B., Jensen, B., Sarrocco, S., Panteris, E., Lagopodi, A.L., Pöggeler, S., Vannacci, G., Collinge, D.B., Hoffmeister, D., Henrissat, B., Lee, Y.H., Jensen, D.F., 2015. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *clonostachys rosea*. *Genome Biol. Evol.* 7, 465–480. doi:10.1093/gbe/evu292
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2014. Strong cellulase inhibition by Mannan polysaccharides in cellulose conversion to sugars. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1341–1353. doi:10.1002/bit.25218
- Liao, H., Li, S., Wei, Z., Shen, Q., Xu, Y., 2014. Insights into high-efficiency lignocellulolytic enzyme production by *Penicillium oxalicum* GZ-2 induced by a complex substrate. *Biotechnol. Biofuels* 7, 1–17. doi:10.1186/s13068-014-0162-2
- Lim, E., Lim, J.Y., Kim, E., Kim, Y.S., Shin, J.H., Seok, P.R., Jung, S., Yoo, S.H., Kim, Y., 2016. Xylobiose, an alternative sweetener, ameliorates diabetes-related metabolic changes by regulating hepatic lipogenesis and miR-122a/33a in db/db Mice. *Nutrients* 8. doi:10.3390/nu8120791
- Mahajan, S., Master, E.R., 2010. Proteomic characterization of lignocellulose-degrading enzymes secreted by *Phanerochaete carnosae* grown on spruce

and microcrystalline cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 1903–1914. doi:10.1007/s00253-010-2516-4

- Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G.J., Grigoriev, I. V, Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., de Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M., Brettin, T.S., 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* 26, 553–560. doi:10.1038/nbt1403
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Odetallah, N.H., Ferket, P.R., Grimes, J.L., Mcnaughton, J.L., 1997. Effect of Mannan-Endo-1 , 4- β -Mannosidase on the Growth Performance of Turkeys Fed Diets Containing 44 and 48 % Crude Protein Soybean Meal. *Poult. Sci.* 81, 1322–1331.
- Poidevin, L., Berrin, J.G., Bennati-Granier, C., Levasseur, A., Herpoël-Gimbert, I., Chevret, D., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Heiss-Blanquet, S., Record, E., 2014. Comparative analyses of *Podospira anserina* secretomes reveal a large array of lignocellulose-active enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7457–7469. doi:10.1007/s00253-014-5698-3
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., Ohlrogge, J.B., 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.* 13, 236–246. doi:10.1016/j.tplants.2008.03.003
- Qing, Q., Yang, B., Wyman, C.E., 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour. Technol.* 101, 9624–9630. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.137
- Santos, F.A., De Queiroz, J.H., Colodette, J.L., Manfredi, M., Queiroz, M.E.L.R., Caldas, C.S., Soares, F.E.F., 2014. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. *Quim. Nova* 37, 56–62. doi:10.1590/S0100-40422014000100011
- Saykhedkar, S., Ray, A., Ayoubi-Canaan, P., Hartson, S.D., Prade, R., Mort, A.J., 2012. A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnol. Biofuels* 5, 52. doi:10.1186/1754-6834-5-52
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263–289. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112315
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008a. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Golden.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008b. Determination

of Extractives in Biomass. Golden.

- Sun, Z., Ge, X., Xin, D., Zhang, J., 2014. Hydrolyzabilities of different corn stover fractions after aqueous ammonia pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 1506–1516. doi:10.1007/s12010-013-0643-y
- Torre, P., Aliakbarian, B., Rivas, B., Domínguez, J.M., Converti, A., 2008. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* 40, 500–506. doi:10.1016/j.bej.2008.02.005
- Vale, L.H.F., Gómez-Mendoza, D.P., Kim, M.S., Pandey, A., Ricart, C. a O., Edivaldo, X.F.F., Sousa, M. V., 2012. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics* 12, 2716–2728. doi:10.1002/pmic.201200063
- van der Weijde, T., Alvim Kamei, C.L., Torres, A.F., Vermerris, W., Dolstra, O., Visser, R.G.F., Trindade, L.M., 2013. The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. *Front. Plant Sci.* 4, 1–18. doi:10.3389/fpls.2013.00107
- van Munster, J.M., Daly, P., Delmas, S., Pullan, S.T., Blythe, M.J., Malla, S., Kokolski, M., Noltorp, E.C.M., Wennberg, K., Fetherston, R., Beniston, R., Yu, X., Dupree, P., Archer, D.B., 2014. The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet. Biol.* 72, 34–47. doi:10.1016/j.fgb.2014.04.006
- Wang, X., Li, K., Yang, M., Wang, J., Zhang, J., 2017. Hydrolyzability of mannan after adsorption on cellulose. *Cellulose* 24, 35–47. doi:10.1007/s10570-016-1098-4
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., Xu, Y., 2012. dbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 40, 445–451. doi:10.1093/nar/gks479
- Zhang, J., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Viikari, L., 2011. The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. *Biotechnol. Biofuels* 4, 60. doi:10.1186/1754-6834-4-60
- Zhang, J., Viikari, L., 2012. Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*. *Bioresour. Technol.* 117, 286–291. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.072

Capítulo 4

*Produção de enzimas pectinolíticas
por *Clonostachys byssicola* em casca
de laranja.*

Introdução

A fruticultura brasileira vem experimentando forte crescimento nas últimas décadas, com destaque para o segmento de frutas cítricas. No ano de 2016, foram produzidas 17 milhões de toneladas de laranja (IBGE, 2016). Parte destas frutas é destinada ao beneficiamento agroindustrial, para a produção de sucos e polpas concentradas. O Brasil é o maior exportador mundial de suco de laranja, tendo comercializado, em 2011, 440 mil toneladas de suco concentrado, e 1,5 milhão de toneladas de suco pronto para beber (FAO, 2011). Os rendimentos da extração são estimados em cerca de 50% para o suco de laranja (Yamanaka, 2005) e, dessa forma, são geradas grandes quantidades de resíduos, que na maioria das vezes são subaproveitados. Estes resíduos apresentam-se ricos em pectina, dada a importância deste polissacarídeo no processo de maturação das frutas (Prasanna et al., 2007).

Diversas alternativas têm sido propostas no intuito de agregar valor aos resíduos agroindustriais. Muitos destes resíduos ainda são subutilizados, e seu acúmulo provoca impactos ambientais. O potencial destes resíduos lignocelulósicos para a indução da produção de enzimas por fungos filamentosos em processos fermentativos tem sido investigado. Estes resíduos apresentam baixo custo e grande disponibilidade, o que permite a obtenção de enzimas a um preço menor. Estima-se que os valores movimentados no mercado mundial de enzimas alcancem a marca de US\$ 6 bilhões em 2016, sendo que as enzimas utilizadas na indústria de alimentos foram estimadas como responsáveis pela movimentação de US\$ 2 bilhões nesse mesmo ano (BCC, 2012). Os resíduos de frutas, por apresentarem elevado teor de pectina, apresentam potencial como indutores da produção de pectinases microbianas, e o fato de representarem substratos baratos e abundantes, poderiam permitir a obtenção de enzimas pectinolíticas a um baixo custo.

As pectinases apresentam grande aplicação em vários setores industriais. Seu uso já é bem estabelecido na indústria de sucos, polpas e purês de frutas, onde o tratamento enzimático permite aumentar a extração de sucos, bem como a redução da viscosidade e turbidez, facilitando os processos operacionais e garantindo a qualidade dos produtos finais. As pectinases, em conjunto com outras enzimas, são aplicadas na remoção de impurezas de fibras de algodão,

um processo denominado biopurga e que era tradicionalmente feito com o uso de soda cáustica. O emprego das enzimas, portanto, apresenta potencial para substituir um processo que gera resíduos, impacto ambiental e consumo elevado de água. As pectinases também são utilizadas como aditivos em rações animais, pois a degradação das pectinas reduz a viscosidade do material, possibilitando o melhor aproveitamento nutricional da ração (Kashyap et al., 2001; Sharma et al., 2013).

Os fungos filamentosos são os organismos mais utilizados para a produção industrial de enzimas. A principal espécie utilizada para a produção de pectinases em nível industrial é o *A. niger* (Gummadi and Panda, 2003). Entretanto, outras espécies também apresentam potencial como produtores de enzimas pectinolíticas. *C. byssicola*, uma espécie conhecida pelo seu potencial como agente de controle biológico, mostrou, em *screening* realizado no Laboratório de Enzimologia, como um candidato em potencial para a produção de enzimas com aplicação biotecnológica. O sequenciamento do genoma da espécie mais estudada do gênero, *C. rosea*, revelou a presença de grande diversidade de pectinases, em especial de pectina liases (Karlsson et al., 2015).

Objetivo

Avaliar o potencial de *C. byssicola* em produzir enzimas pectinolíticas (pectinase e pectato liase) quando cultivado em meio líquido contendo casca de laranja.

Objetivos específicos

1. Caracterizar o secretoma de *C. byssicola* produzido sob indução da casca de laranja;
2. Monitorar a produção de pectinases e pectato liases ao longo do crescimento do fungo;
3. Purificar e caracterizar as pectinases produzidas por *C. byssicola*;
4. Expressar uma das pectinases identificadas em *Pichia pastoris*.

Material e Métodos

Reagentes Químicos e substrato lignocelulósico

Todos os reagentes químicos e substratos para ensaio enzimático foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), exceto quando especificados. Os solventes utilizados nas análises de espectrometria de massas (acetonitrila, ácido fórmico e água de grau de pureza apropriado para LC-MS/MS) também foram adquiridos da Sigma Aldrich. A tripsina utilizada na digestão prévia das proteínas à identificação por LC-MS/MS foi adquirida da Promega (Madison, WI, EUA).

A casca de laranja utilizada neste trabalho foi obtida a partir de frutos sadios da variedade pêra, adquiridos em mercados locais da cidade de Brasília (DF). Os frutos foram lavados em água corrente e descascados, e as cascas foram submetidas a secagem em estufa a 65°C durante 24 horas. Após a secagem, as cascas foram trituradas em moinho de bancada, e armazenadas em local seco.

Meio de cultura

Com o intuito de se avaliar a influência do meio de cultura sobre a produção de pectinases, foram testados três meios distintos: Meio Mínimo suplementado (MM, Tabela 4.1), Meio de Mandels & Weber (Meio MW, Tabela 4.2), e Meio TLE (Tabela 4.3).

Erlenmeyers de 250 mL foram preenchidos com 50 mL de cada um dos meios de cultura. Como fonte de carbono, foi utilizada casca de laranja na concentração de 1%. Placas de *C. byssicola* com 15 dias de crescimento foram utilizadas para a preparação de uma suspensão de esporos com concentração estimada de aproximadamente 10^7 esporos/mL. Os meios de cultura autoclavados foram inoculados com alíquotas da suspensão de esporo correspondentes a 1% do volume do meio de cultura. Os frascos foram incubados em shaker a 28°C e sob agitação de 120 rpm, durante 7 dias. Após o período de cultivo, os meios foram filtrados a vácuo em papel de filtro do tipo Whatman nº5, e o material filtrado, denominado extrato bruto, foi preservado pela

adição de azida sódica na concentração final de 0,1%. Os extratos brutos foram avaliados quanto à atividade de pectinase e pectato liase. Os dados foram analisados por ANOVA, seguida por teste de Tukey, com 95% de significância ($p < 0,05$), usando o programa Statistica.

Tabela 4.1. Composição do meio Mínimo Suplementado.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
KH ₂ PO ₄	7,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de Levedura	0,6
*Ajustar o pH para 7,0.	

Tabela 4.2. Composição do meio mineral de Mandels & Weber

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
KH ₂ PO ₄	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4
CaCl ₂ .H ₂ O	0,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
Elementos-traço	
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 mg/MI
MnSO ₄ .H ₂ O	1,6 mg/MI
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4 mg/MI
CoCl ₂	2,0 mg/MI
Tween-80	1,0 mL/L
Peptona	1,0 g/L

Tabela 4.3. Composição do meio TLE.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Bacto Peptona	1,0
Uréia	0,3
KH ₂ PO ₄	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
CaCl ₂	0,3
Glicose (ou outra fonte de C)	5,0
Solução de elementos-traço	1 MI
Solução de Elementos-traço	
Ácido Cítrico	5,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,0
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	1,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
H ₃ BO ₃	0,05
NaNO ₃	0,05

Efeito da fonte de nitrogênio

O efeito de diversas fontes de nitrogênio sobre os níveis de atividade enzimática em função do cultivo de *C. byssicola* em meio de MW foi avaliado. A quantidade de nitrogênio foi fixada em 1,4 gramas, mas foram utilizadas duas fontes de nitrogênio inorgânicas (sulfato de amônio-(NH₄)₂SO₄ e nitrato de sódio-

NaNO₃) e três fontes de nitrogênio orgânicas (uréia, extrato de levedura e tripton). Os cultivos foram realizados a 28°C e 120 rpm durante 7 dias. Os extratos brutos foram filtrados utilizando papel de filtro e bomba a vácuo, e os níveis de pectinase e pectato liase foram aferidos a partir dos respectivos ensaios, descritos posteriormente. Os dados foram analisados por ANOVA, seguida por teste de Tukey, com 95% de significância ($p < 0,05$), usando o programa Statistica.

Curva de indução

Com o intuito de avaliar o melhor dia para a produção de enzimas, *C. byssicola* foi cultivado em meio MW durante sete dias. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 2 L, contendo 500 mL de meio e 1% de casca de laranja. Diariamente, alíquotas de 1 mL foram coletadas, e as atividades de pectinase e pectato liase foram avaliadas.

Ensaio Enzimáticos

Pectinase

Os ensaios de pectinase foram realizados em microescala, utilizando microplacas de PCR. Foram utilizados 5 µL de enzima, e 10 µL de pectina de frutas cítricas a 1 % (p/w). As microplacas foram incubadas a 50°C durante 10 minutos. Após a reação, foram adicionados 30 µL de DNS e as placas foram submetidas à fervura durante 10 minutos. O nível de açúcares redutores totais foi avaliado após leitura dos ensaios a 540 nm, e utilizando-se uma curva padrão feita com diferentes concentrações de ácido galacturônico. Os resultados foram exibidos em U.I./mL, sendo U.I a quantidade de enzima responsável pela liberação de 1 µmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições do ensaio.

Pectato Liase

O ensaio de para pectato liase foi adaptado a partir do protocolo proposto por (Minussi et al., 1997). Foram utilizados 75 µL de extrato bruto apropriadamente diluído, e 50 µL de pectina, extraída de frutas cítricas, na concentração de 2,5% e tamponada com tampão bicarbonato de sódio, pH 10,5

(pH final no substrato: 9,4). Os tubos foram incubados em banho-maria a 40°C durante 15 minutos, e após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,375 mL de ácido clorídrico (HCl) 10 mM. Os volumes das reações foram lidos em espectrofotômetro, utilizando cubeta de quartzo, a 235 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na concentração de galacturonídeos insaturados, e os valores foram expressos em U/mL, sendo que 1 U corresponde à quantidade de enzima que produz 1 nmol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições do ensaio.

Caracterização do secretoma de *C. byssicola*

Com o intuito de se avaliar a diversidade de enzimas pectinolíticas produzidas por *C. byssicola*, uma alíquota proveniente de cultivo do fungo em meio MW durante 04 dias foi preparada para a caracterização do secretoma por LC-MS/MS. O extrato bruto foi precipitado com acetona e NaCl 30 mM, segundo método proposto por (Crowell et al., 2013). Após a precipitação, as proteínas foram ressuspensas em água MilliQ, e a concentração de proteína total foi estimada, conforme descrito anteriormente. Uma alíquota correspondente a 40 µg de proteína foi concentrada e secada em evaporador do tipo *Speed Vac* durante 2 horas, a 30°C. O *pellet* resultante foi ressuspensado em tampão contendo uréia 8M, NaCl 0,0075M e bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 0,05M (pH final do tampão=8,2). Posteriormente, a solução foi acrescida de ditioneína (DTT) na concentração final de 0,005M, e incubada a 55°C durante 25 minutos. Após o período de incubação e resfriamento da solução, uma alíquota de iodoacetamida foi adicionada com concentração final de 0,014M, e os tubos permaneceram a temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 40 minutos. O processo de alquilação dos resíduos de cisteína promovido pela iodoacetamida foi interrompido pela adição de DTT (concentração final de 0,005M), e a solução foi diluída, na proporção de 1:5, com TEAB 0,025M (pH 7,9) e cloreto de cálcio (CaCl₂) na concentração final de 0,001M. Foi adicionada tripsina (1 µg/50 µg de proteína total), e a digestão das proteínas foi realizada a 37°C, durante a noite. Posteriormente, a solução foi acidificada pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) na concentração final de 0,5%.

Após a digestão, os peptídeos tripticos foram dessalinizados a partir do uso de *Stage Tips* preenchidas com resina hidrofóbica C18 (REF). Os peptídeos

foram eluídos da resina a partir de uma série de lavagens sequenciais com os seguintes eluentes: 1) solução de acetonitrila 25% e ácido acético 0,5%; 2) solução de acetonitrila 50% e ácido acético 0,5%; 3) solução de acetonitrila 80% e ácido acético; e 4) acetonitrila 100%. Após a eluição, o eluído contendo os peptídeos trípticos foi evaporado e concentrado em *Speed-Vac*, e quantificado por fluorometria (Qubit, ThermoFischer Scientific).

LC-MS/MS

Uma carga dos peptídeos trípticos equivalente a 1 µg foi injetada em coluna empacotada com resina Reprosil-Pur 120 C18-AQ (tamanho de partícula de 5 µm, 5 cm de comprimento, diâmetros interno e externo de 100 µm e 360 µm, respectivamente). A coluna foi empacotada utilizando um Nano LC Ultimate 3000 (Dionex, Amsterdã, Holanda). Após lavagem com solvente A (acetonitrila (ACN) 5% (v/v), ácido fórmico (AF) 0,1% (v/v)), os peptídeos foram eluídos durante o gradiente em uma coluna empacotada com a mesma resina (tamanho de partícula 3 µm, 15 cm de comprimento, diâmetros interno e externo de 75 µm e 360 µm, respectivamente), em um fluxo de 250 nL/min. O gradiente consistiu de uma etapa de 5-20% do solvente B (ACN 95% (v/v), AF 0,1% (v/v)) durante 30 minutos; 20-50% do solvente B durante 15 minutos; 50-98% do solvente B durante 5 minutos; e 98% do solvente B durante 10 minutos. Os peptídeos foram dinamicamente eluídos em um espectrômetro de massas do tipo LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), através de uma sonda do tipo *nanospray* (Thermo Scientific, Alemanha), com uma voltagem de *spray* de 3,02 kV, e temperatura de transferência capilar programada para 275°C. O espectrômetro foi operado no modo de Aquisição Dependente de Dados usando o programa Xcalibur versão 2.2 (Thermo Scientific). O ciclo de aquisição consistiu de um escaneamento na faixa de 350-1500 *m/z* a uma resolução de 120000 (largura completa na metade do máximo) em *m/z* de 400. Foi utilizado um *microscan* de 5×10^5 cargas no Orbitrap. Uma fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) sob energia normalizada de colisão de 35% foi utilizada na fragmentação dos 15 precursores de carga múltipla mais intensos. O limite de seleção de íons para MS/MS foi programado para 1500 contagens usando uma janela de isolamento de precursor de 2 amu. A ativação do

parâmetro "q" e o tempo de ativação foram programados para 0,25 e 0,10 ms, respectivamente. Os precursores previamente fragmentados foram dinamicamente excluídos durante o ciclo por mais 30 segundos.

Identificação das proteínas

Os arquivos foram analisados contra o genoma de *C. rosea* (Karlsson et al., 2015), utilizando o programa Peaks, versão 7 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontário, Canadá). As proteínas foram identificadas considerando a detecção de, pelo menos, dois peptídeos únicos, e uma taxa de descoberta de falsos-positivos (FDR) de 1%. Foram empregados filtros de tolerância de 0,5 Da para espectros parentais e 10 ppm para espectros sequenciais (*tandem*). Foram geradas listas de identificação independentes para cada condição.

Purificação parcial de pectinases

O extrato bruto obtido após o crescimento de *C. byssicola* durante 4 dias foi concentrado por ultrafiltração, utilizando-se membrana de celulose regenerada com ponto de corte de 50 kDa (Millipore) em sistema de ultrafiltração Amicon (Millipore). A atividade enzimática foi mensurada nas frações concentrada e ultrafiltrada. O teor de proteínas foi dosado utilizando um kit comercial (BioRad, Hercules, CA, EUA) baseado no método de Bradford, (1976).

A fração concentrada obtida após a ultrafiltração foi aplicada em coluna de troca aniônica SP Sepharose *Fast Flow* (5,2x2,8 cm, SPFF-GE *Healthcare*, Suécia). A cromatografia foi realizada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, sob fluxo de 30 mL/hora, e foram coletados 5 mL por fração. As frações eluídas foram avaliadas quanto à presença de atividades de pectinase, mananase, xilanase e CMCase. As proteínas associadas à resina foram eluídas utilizando gradiente com tampão acetato 50 mM, pH 5, com variação na concentração de NaCl de 0 a 1 M.

As frações contendo atividade de pectinase eluídas durante o gradiente em SPFF foram reunidas, dialisadas contra água destilada a 4°C durante a noite, e aplicadas em coluna de afinidade contendo a resina de concanavalina-A (ConA Sepharose, 9x2,8 cm, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A cromatografia foi realizada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, acrescido de NaCl 0,5 M,

cloreto de cálcio (CaCl_2) e sulfato de manganês (MnSO_4), ambos na concentração de 2 mM, sob fluxo de 30 mL/hora, e foram coletados 5 mL por fração. As frações eluídas foram avaliadas quanto à presença de atividades de pectinase. As proteínas associadas à resina foram eluídas utilizando gradiente com o mesmo tampão acetato com variação na concentração de metilglicose de 0 a 0,5 M.

Eletroforese e Zimograma

O grau de pureza das amostras ao longo das etapas de purificação foi avaliado por meio de eletroforese em gel de poliácridamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme método preconizado por Laemmli, (1970). Os géis foram corados com solução de nitrato de prata (AgNO_3).

A atividade *in gel* de pectinase foi avaliada através de zimograma, conforme método adaptado a partir de Bischoff et al., (1998). Foram polymerizados géis de poliácridamida com pectina de frutas cítricas, na concentração final de 0,1%. Após a eletroforese, os géis foram lavados, por duas vezes, com solução de Triton X-100 a 2,5%, durante 30 minutos. Em seguida, os géis foram novamente lavados por duas vezes com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, durante 30 minutos, para a remoção do excesso de Triton X-100. Após todas essas lavagens, os géis foram imersos em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, e incubados em estufa a 50°C durante 1 hora. Após a incubação, o gel foi resfriado, lavado com água destilada, e corado com vermelho de rutênio 0,02% durante 30 minutos (Cruickshank and Wade, 1980). Posteriormente, os géis foram novamente lavados com água destilada, para a revelação das bandas claras resultantes e as bandas claras, resultantes da digestão *in gel* da pectina, foram reveladas.

Efeito de temperatura e pH

A fração de pectinase parcialmente purificada e eluída após o gradiente em coluna SPFF foi caracterizada quanto ao efeito de temperatura e pH sobre a atividade enzimática. A atividade foi avaliada na faixa de temperatura de 30-90°C, sendo o ensaio realizado conforme descrito previamente. Para o efeito do pH, foi utilizada pectina de frutas cítricas, a 1%, tamponada por três tampões:

acetato (pH 3-6,5), fosfato (pH 6,5-7,5) e Tris-HCl (pH 7,5-9). Todos os tampões foram utilizados na concentração final de 50 mM. Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito previamente.

Identificação de uma das pectinases parcialmente purificadas

A fração com atividade de pectinase eluída durante o gradiente na cromatografia com coluna SPFF foi resolvida por SDS-PAGE. A banda mais intensa observada no gel foi excisada, submetida à digestão com tripsina e identificada por LC-MS/MS. Inicialmente, as bandas foram tratadas com hexaferriacianeto de potássio e tiosulfato de sódio, para a remoção da coloração de prata, conforme método descrito por Gharahdaghi et al., (1999). Após a etapa de descoloração, as bandas de gel foram extensivamente lavadas com água Milli-Q, até que toda a coloração amarela das bandas tenha sido removida. Posteriormente, as bandas de gel foram transferidas para um microtubo limpo de 2 mL, e aos tubos foram adicionados 100 µL de bicarbonato de trietilamônio (TEAB, pH=8,0) 0,1 M/acetonitrila (ACN) 100% (1:1). As bandas de gel permaneceram nessa solução durante 20 minutos, a temperatura ambiente, com agitação ocasional em agitador do tipo *vortex*. Foram adicionados 500 µL de ACN 100%, e após as bandas adquirirem uma coloração esbranquiçada, os tubos foram rapidamente centrifugados (*spin*), e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados entre 30 e 50 µL de DTT 0,01 M, preparado em TEAB 0,1M (o volume adicionado foi suficiente para cobrir totalmente as bandas). Os tubos foram incubados a 56°C durante 30 minutos. Após a incubação, os tubos foram resfriados, e adicionados 500 µL de ACN 100%. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos, e foram posteriormente centrifugados, e os sobrenadantes descartados. As bandas foram tratadas com solução de iodoacetamida 0,055 M em TEAB 0,1 M, sendo adicionados entre 30 e 50 µL. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos, e ao abrigo de luz. Após a incubação, foram adicionados 500 µL de ACN 100%, e os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados, os sobrenadantes foram removidos, e as bandas de gel foram submetidas à secagem em evaporador do tipo *Speed Vac*. Após a secagem, foram adicionados 50 µL de tampão TEAB 0,1M contendo tripsina na concentração de 15 ng/µL, e os géis foram macerados e incubados a

37°C por até 16 horas. Após a incubação, os tubos foram centrifugados, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com baixa capacidade de adsorção de peptídeos (*Low-binding*, Eppendorf). Os *debris* de gel que permaneceram no tubo foram submetidos à extração dos peptídeos com ACN 50%. Foram adicionados 50 µL dessa solução, e os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos, com agitação em *vortex* a cada 10 minutos. Os tubos foram centrifugados, e o sobrenadante foi reunido junto com o sobrenadante coletado após a incubação com tripsina. O material coletado foi submetido à dessalinização e identificação dos peptídeos por LC-MS/MS, conforme método descrito anteriormente para a análise do secretoma.

Clonagem e expressão de uma das pectinases parcialmente purificadas

Extração de RNA total

Para a obtenção de micélio isolado, *C. byssicola* foi crescido em cultivo estacionário. Esta estratégia foi necessária, pois uma vez que o meio de cultivo apresenta uma fonte de carbono sólida, o micélio não poderia ser separado da fonte de carbono, o que poderia comprometer a extração, já que haveria muita contaminação com resíduos de casca de laranja. O cultivo foi realizado em erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL de meio MW com casca de laranja na concentração de 1% (p/v). Os meios foram inoculados com 1% de uma suspensão de esporos com concentração de aproximadamente 1×10^7 esporos/mL. Os frascos foram incubados a 28°C durante 5 dias. Após o cultivo, o micélio presente na superfície do meio de cultura foi coletado com o auxílio de uma pinça estéril, e imediatamente macerado em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando-se reagente Trizol (Life Technologies), conforme método recomendado pelo fabricante. A qualidade do RNA extraído foi avaliada a partir de eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL. As bandas foram visualizadas em transiluminador com luz ultravioleta.

Alíquotas do RNA extraído foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit de transcrição reversa GoScript (Promega, Madison, WI, EUA). O procedimento foi preparado segundo as instruções sugeridas pelo fabricante, utilizando-se primers randômicos e primers

Oligo(DT)₁₅. O DNA obtido foi utilizado para a pesquisa pelo gene codificante para a pectinase parcialmente purificada em SPFF, através de PCR com primers específicos.

Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Com base na identificação da pectinase parcialmente purificada após cromatografia em SPFF e no genoma de *C. rosea* (Karlsson et al., 2015), foram desenhados os primers para a amplificação do transcrito correspondente à enzima: Direto (F): 5' ATCGGAATTCAGCCCAGCGCCCCCTGCTG 3' e Reverso (R): 5' ATCGTCTAGACTAGGAGCACTGGACGGGGCTATTC 3', sendo as áreas destacadas correspondentes aos sítios de clivagem para as enzimas *EcoRI* (Thermo Fischer Scientific) e *XbaI* (Thermo Fischer Scientific), respectivamente. Os primers foram adquiridos da IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IO, EUA). O desenho dos primers, bem como todo o planejamento da clonagem foram realizados utilizando o programa Genome Compiler, versão 2.2.86. A predição da sequência de peptídeo sinal presente no transcrito foi realizada a partir do programa Signal IP.

A reação de PCR foi constituída de: tampão de reação (1x), 0,05 µM dos primers F e R, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidade de *Taq* polimerase e até 50 ng de DNA. A programação dos ciclos foi de: uma etapa inicial a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos três etapas: 95°C por 10 segundos/60°C por 1 minuto/72°C por 1 minuto; e uma etapa final de 72°C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados empregando o kit de purificação GeneJET PCR (Thermo Scientific). A qualidade e integridade dos produtos de reação foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente.

Digestão, ligação e transformação de *Escherichia coli* XL10 Gold

O vetor utilizado neste trabalho foi o pGAPZα-A (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), que apresenta o promotor do gene que codifica para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Figura 4.1). Dessa forma, o gene de interesse será constitutivamente expresso quando do crescimento de *Pichia pastoris* em glicose ou glicerol. Ainda, o vetor apresenta como marca de seleção a resistência ao

antibiótico zeocina. O vetor e o inserto (produto de PCR purificado) foram submetidos à digestão com *EcoRI* e *XbaI* (as reações foram compostas de tampão 1x, 3 µg de DNA, e cada enzima na concentração de 1 U/µg de DNA). As reações foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante das enzimas. A qualidade digestão foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose, utilizando amostras digeridas e não-digeridas. O vetor digerido foi posteriormente submetido à desfosforilação com fosfatase alcalina (Fast AP, Thermo Scientific), para evitar a relinearização. A reação foi composta por 3 µg de DNA, tampão 1x, e 1 U de fosfatase para cada µg de DNA. A reação foi realizada à 37°C durante 10 minutos, e a fosfatase foi posteriormente inativada a 75°C durante 5 minutos.

Após a digestão e desfosforilação, as amostras de DNA do inserto e do vetor foram purificadas, utilizando o mesmo procedimento de purificação de produtos de PCR descritos anteriormente. Após a purificação, a ligação do inserto ao vetor foi realizada utilizando-se a enzima T4 DNA-ligase (Thermo Scientific). Foram montados dois sistemas de ligação: 1:3 (10 ng de vetor: 30 ng de inserto) e 1:5 (10 ng de vetor: 50 ng de inserto). Em ambas as reações, as proporções de enzima e tampão foram consideradas de acordo com as instruções do fabricante. Após a montagem e homogeneização cuidadosa dos sistemas de ligação, os tubos foram mantidos em geladeira, a 4°C, durante a noite. A efetividade da ligação foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose.

O plasmídeo final, obtido após a reação de ligação, foi utilizado na transformação de células termocompetentes de *E. coli* XL10 *Gold*. Os microtubos contendo os estoques das células, mantidos a -80°C, foram transferidos para o gelo para descongelarem. Em seguida, foram adicionados 5 µL do sistema de ligação (equivalente a 5% do volume de células competentes) à alíquota de células, e os tubos permaneceram no gelo por 30 minutos. Foram, então, adicionados 900 µL de meio Lúria-Bertani (LB: extrato de levedura-5%; Peptona-1%; NaCl-1%), as células foram cuidadosamente homogeneizadas, e mantidas em incubadora do tipo *shaker*, a 37°C, durante 1 hora, e sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi removido, e as células foram cuidadosamente ressuspensas em 200 µL de meio LB. Essa suspensão foi

semeada em placas contendo ágar LB acrescido do antibiótico Zeocina (Thermo Scientific) na concentração de 50 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

Após a incubação, algumas das colônias crescidas foram selecionadas, e transferidas para tubos contendo caldo LB acrescido de Zeocina (50 µg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C e 150 rpm por até 16 horas. Após o cultivo, os tubos foram centrifugados, e o *pellet* de células foi utilizado para a extração de DNA plasmidial, utilizando o kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). O DNA plasmidial obtido foi submetido à PCR utilizando primers específicos para o plasmídeo pGAPZαA (os primers foram específicos para sequências nas regiões do promotor pGAP, e do terminador AOX, indicadas no manual do fabricante). Os produtos de PCR foram purificados, e encaminhados para sequenciamento na Universidade Católica de Brasília (UCB), utilizando sequenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems).

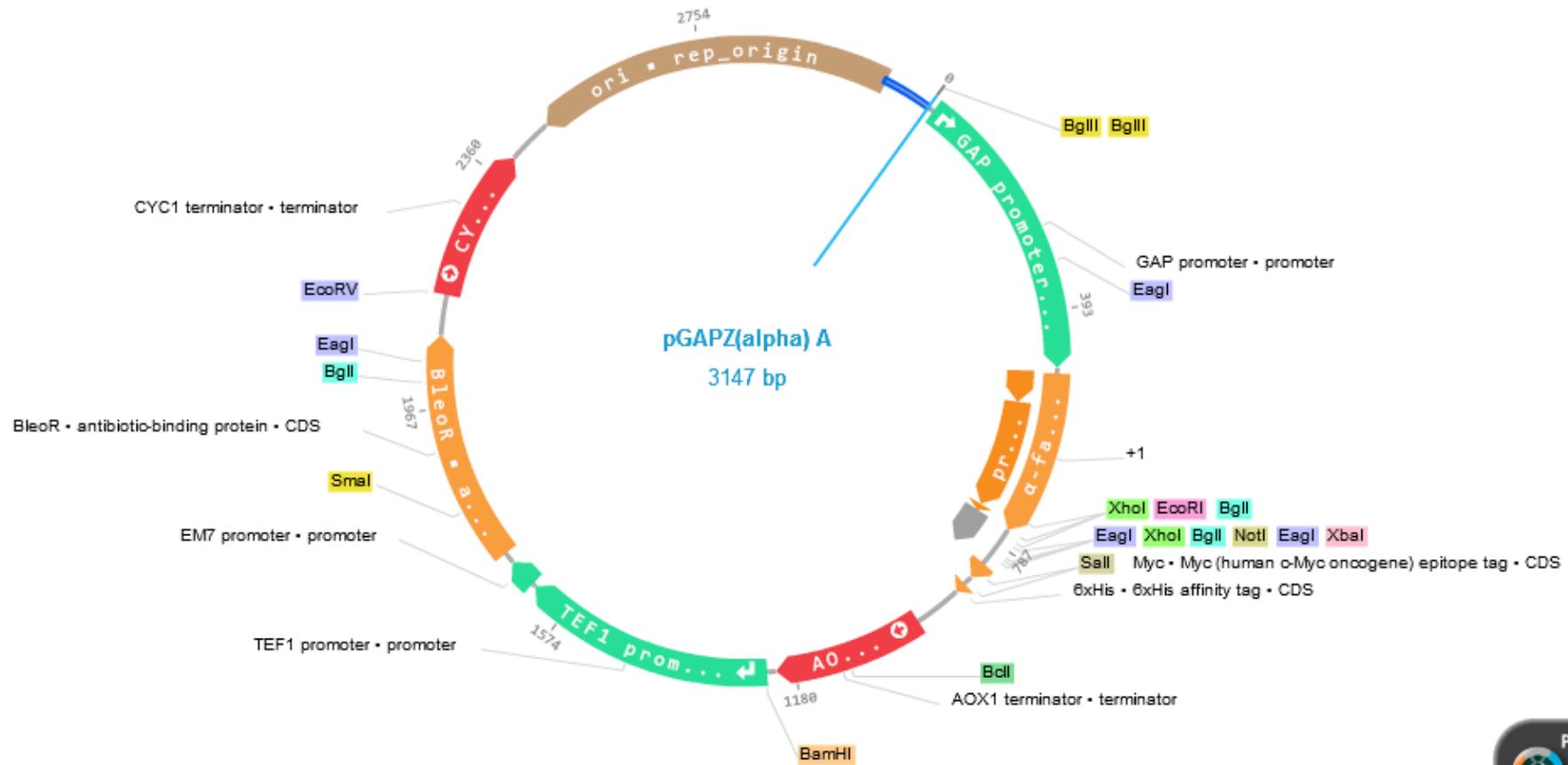


Figura 4.1. Esquema do plasmídeo pGAPZαA.

Extração de DNA plasmidial em média escala (*midprep*)

Após a análise dos resultados do sequenciamento, um dos clones transformados com o plasmídeo final foi cultivado em 200 mL de meio LB contendo zeocina (50 µg/mL) a 37°C por até 16 horas. Após o cultivo, as células foram decantadas a 3000xg durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O *pellet* resultante foi ressuscitado em tampão STE (NaCl 0,1 M; Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM; EDTA (pH 8,0) 1 mM) gelado, e as células foram novamente decantadas por centrifugação a 3000xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado de células foi ressuscitado em 5 mL de solução I (glicose 50 mM; Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM; EDTA (pH 8,0) 10 mM). Foram adicionados 10 mL de solução II (NaOH 0,2 N; SDS 1%), e os tubos foram incubados no gelo durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 7,5 mL de solução III (acetato de potássio 3 M; ácido acético 2 M), e os tubos foram levemente agitados por inversão, e incubados no gelo por mais 20 minutos. Os tubos foram, então, centrifugados a 10000xg e 4°C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo tubo. A centrifugação foi repetida, e o sobrenadante novamente transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante, foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol, e os tubos permaneceram à temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 120000xg durante 20 minutos, e o *pellet* resultante foi lavado com etanol 70%. Após secagem, este precipitado foi ressuscitado em 500 µL de tampão TE (Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM; EDTA 1 mM). O material reconstituído foi tratado com RNase A (Thermo Scientific), na concentração de 2 µg/mL, e incubado a 37°C durante 30 minutos. Foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio (1:1), e os tubos foram intensamente homogeneizados em *vortex*, para permitir a precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados a 5000xg durante 5 minutos, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, e homogeneizada em *vortex* com 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram novamente centrifugados a 5000xg durante 5 minutos, e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. O sobrenadante coletado foi acrescido de 1 volume de isopropanol, e acetato de sódio em concentração final de 0,3 M. Os tubos foram mantidos a -20°C durante 1 hora, e depois foram centrifugados a 12000xg

durante 30 minutos, e a 4°C. O *pellet* de DNA foi lavado com etanol 70% gelado, e após secagem, foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE, e quantificado.

Transformação de *Pichia pastoris* X-33

O plasmídeo foi linearizado utilizando a enzima *AvrII* (Thermo Scientific), de acordo com instruções do fabricante. A avaliação da linearização foi feita por eletroforese em gel de agarose. O vetor linearizado foi utilizado para a transformação de *P. pastoris*.

A cepa X-33 de *P.pastoris* foi utilizada neste trabalho, para a expressão heteróloga da endopoligalacturonase identificada de *C. byssicola*. Uma colônia isolada foi transferida para 50 mL de caldo YPD (glicose 2% p/v; peptona 2% p/v; e extrato de levedura 1% p/v), e os erlenmeyers foram incubados a 28°C e 200 rpm por até 16 horas. Este cultivo serviu de pré-inóculo para outro cultivo, realizado em 100 mL do mesmo meio YPD. Quando a densidade óptica (OD) deste último cultivo atingiu a faixa de 1,3-1,5, as células foram decantadas por centrifugação a 1500xg e 4°C, durante 5 minutos. O precipitado de células foi lavado duas vezes com água destilada estéril e gelada, sendo que cada lavagem foi sucedida por um ciclo de centrifugação nas mesmas condições da etapa anterior. As células foram, posteriormente, lavadas com 5 mL de sorbitol 1 M estéril e gelado, e centrifugadas também a 1500xg e 4°C, durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 150 µL de sorbitol 1 M estéril e gelado, e 80 µL dessa suspensão foi transferida para um novo microtubo, e misturado com 10 µg de DNA linearizado. A mistura foi transferida para uma cubeta Gene Pulser, com espaçamento de 0,2 cm entre os eletrodos (BioRad, Hercules, CA, EUA). A cubeta permaneceu no gelo por 5 minutos, e depois foi inserida em eletroporador (BioRad), programado para 1500 V, 400 Ω e 25 µF. Após a eletroporação, a cubeta foi imediatamente transferida para o gelo, e foram adicionados 1 mL de sorbitol 1 M gelado e estéril. O conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado, e transferido para um microtubo de 2 mL. As células permaneceram incubadas a 28°C por pelo menos duas horas, para recuperação. Após a incubação, a suspensão de células foi semeada em placas contendo ágar YPD acrescido de zeocina na concentração de 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 28°C por até 5 dias, e as colônias crescidas foram novamente repicadas para outras placas, de forma a confirmar a seleção.

Posteriormente, as colônias transformadas foram cultivadas em caldo YPD acrescido de zeocina, e foram conservadas com glicerol 20% (v/v) em ultrafreezer a -80°C.

Screening da produção de pectinase

A produção de pectinase pelos clones transformados foi inicialmente avaliada por meio do cultivo em placas contendo ágar YNB (Difco) com glicerol 10% (p/v), biotina (100 µg/mL) e copolimerizado com ácido poligalacturônico (Sigma-Aldrich) na concentração final de 1%. Também foi inoculado um controle negativo (*P. pastoris* X-33 transformada com o pGAPZαA sem o inserto). As placas foram incubadas a 28°C por 07 dias, e após a incubação as colônias foram lavadas da superfície do ágar com água destilada, e a presença de halos de degradação foi revelada adicionando-se solução de HCl 6 M até a completa precipitação do ácido poligalacturônico (Blanco et al., 1994). Como controle positivo, foi utilizado o cultivo de *C. byssicola* em casca de laranja durante 4 dias. Com o auxílio de uma ponteira de 200 µL, foi feito um orifício no ágar, onde o extrato bruto foi depositado. A adição do controle positivo foi realizada 12 horas antes da revelação dos halos com HCl, e durante esse período, as placas permaneceram incubadas à 28°C, para permitir a digestão do ácido poligalacturônico.

Algumas colônias também foram avaliadas quanto à produção de pectinases em meio líquido. Para tanto, as colônias foram inicialmente crescidas em tubos de 50 mL contendo 7,5 mL de meio YNB com 10% (p/v) de glicerol e biotina (100 µg/mL). Os tubos foram incubados a 28°C e 200 rpm por 48 horas. As células foram coletadas e concentradas por centrifugação a 5000xg por 5 minutos. A partir deste pré-inóculo, erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio YNB foram inoculados, de modo a obter uma suspensão de células inicial com OD de 0,5. Os erlenmeyers foram incubados em shaker a 28°C e 200 rpm, e durante intervalos definidos, uma alíquota foi coletada e avaliada quanto à OD e atividade de pectinase. No último ponto de coleta, todo o meio de cultura foi coletado e centrifugado, e o sobrenadante e o precipitado de células foram utilizados para avaliar o perfil de proteínas por SDS-PAGE. O precipitado de células foi submetido à extração de proteínas, utilizando o reagente Y-PER (Thermo Scientific) e o protocolo recomendado pelo fabricante.

Resultados e Discussão

Padronização do meio de cultura e da fonte de nitrogênio

A produção de enzimas pectinolíticas por *C. byssicola* foi avaliada em três meios distintos. Os resultados são mostrados na Figura 4.2. Pela análise dos dados, observa-se que o fungo produziu os maiores níveis de atividade pectinolítica no meio MW ($p < 0,05$, Figura 4.2a), e os menores níveis de atividade foram observados no meio MM. Uma tendência inversa foi observada para os níveis de pectato liase (Figura 4.2b), em que os menores níveis foram observados em meio MW ($p < 0,05$), e não houve diferença significativa entre os níveis observados de atividade de pectato liase nos meios MM e TLE ($p < 0,05$). Em função da melhor produção de pectinase em meio MW, os estudos prosseguiram com o cultivo neste meio. O efeito de diversas fontes de nitrogênio sobre a produção de pectinases e pectato liases por *C. byssicola* cultivado em meio MW foi avaliado, e os resultados são apresentados na Figura 4.3. Assim como observado para os meios de cultura, as atividades de pectinase e pectato liase exibiram tendências diferentes em função da fonte de nitrogênio avaliada. As maiores atividades de pectinase foram observadas quando o fungo foi crescido em meio com sulfato de amônio (Figura 4.3a, $p < 0,05$), enquanto que as menores atividades foram observadas em meio contendo nitrato de sódio e uréia ($p < 0,05$). Estas mesmas fontes de nitrogênio induziram os menores títulos de atividade de pectato liase (Figura 4.3b, $p < 0,05$). No entanto, ao contrário do que foi observado para as pectinases, não houve diferenças significativas entre os níveis observados de pectato liase nos meios contendo sulfato de amônio, extrato de levedura ou triptona (Figura 4.3b, $p < 0,05$). Os dados apresentados demonstram que as atividades de pectinase e pectato liase acompanham tendências diferentes em função do meio de cultura e da fonte de nitrogênio utilizados. Este resultado sugere que as diferenças observadas nas atividades pectinolíticas avaliadas são resultado de mecanismos regulatórios específicos para cada tipo de enzima, e não de variações no crescimento do fungo em função das condições utilizadas. Infelizmente não foi possível determinar a biomassa fúngica em cada uma das condições avaliadas. No entanto, caso as variações de níveis de atividade observados fossem meramente resultantes da

variação do crescimento do fungo entre as condições, estas variações deveriam seguir uma tendência semelhante, o que não foi observado.

A otimização da produção de enzimas pectinolíticas tem sido reportada em vários estudos disponíveis na literatura. Os resultados são altamente variáveis, especialmente em função da espécie de fungo utilizada, bem como do resíduo lignocelulósico utilizado como fonte de carbono. Li et al., (2014) avaliaram a produção de pectinases por um isolado de *Penicillium oxalicum* crescido em cascas de laranja, e avaliaram o efeito de cinco fontes de nitrogênio sobre os níveis de atividade enzimática produzidos: sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de sódio, uréia e peptona. Os maiores índices de atividade foram identificados com a utilização de cloreto de amônio. Jurick et al., (2012) verificaram o efeito de cloreto de amônio e fontes de nitrogênio orgânicas (uréia, glutamina, glutamato e asparagina) sobre a produção de pectinases por *P. expansum* cultivado em pectina de maçã. Os maiores níveis foram observados quando cloreto de amônio foi adicionado ao meio, ao passo que o crescimento fúngico foi maior quando as fontes nitrogenadas presentes no meio eram glutamato ou glutamina, evidenciando a independência entre níveis de enzima produzidos e crescimento fúngico.

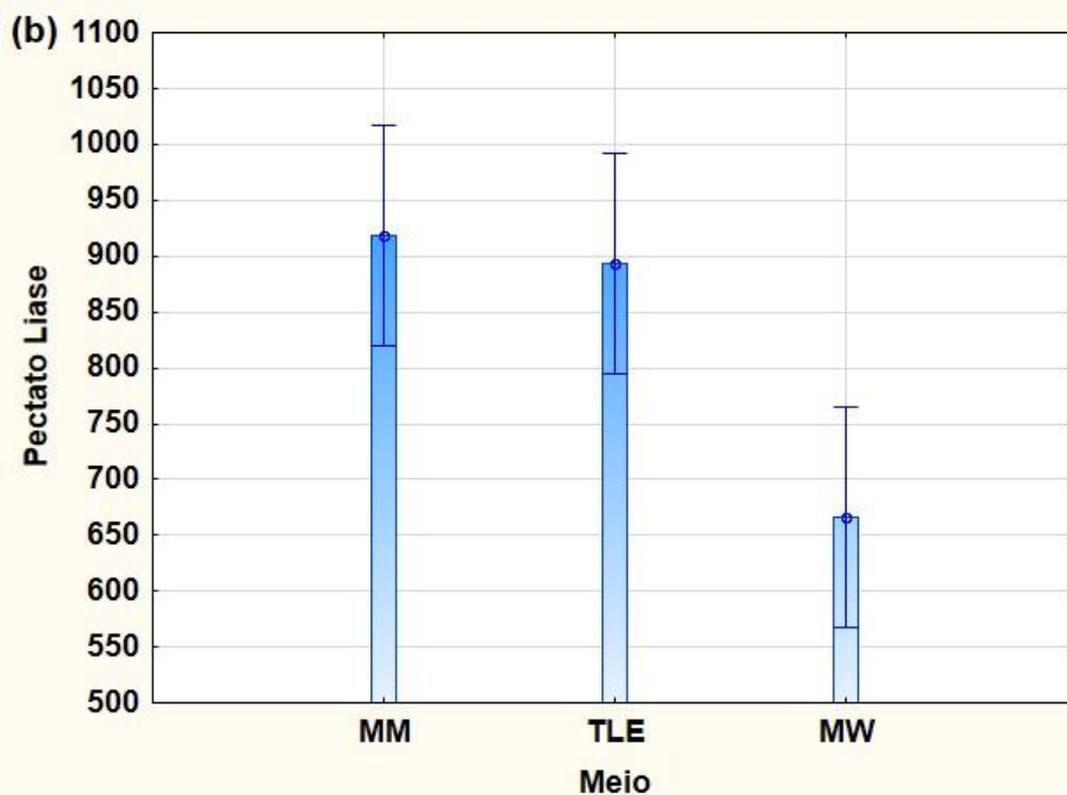
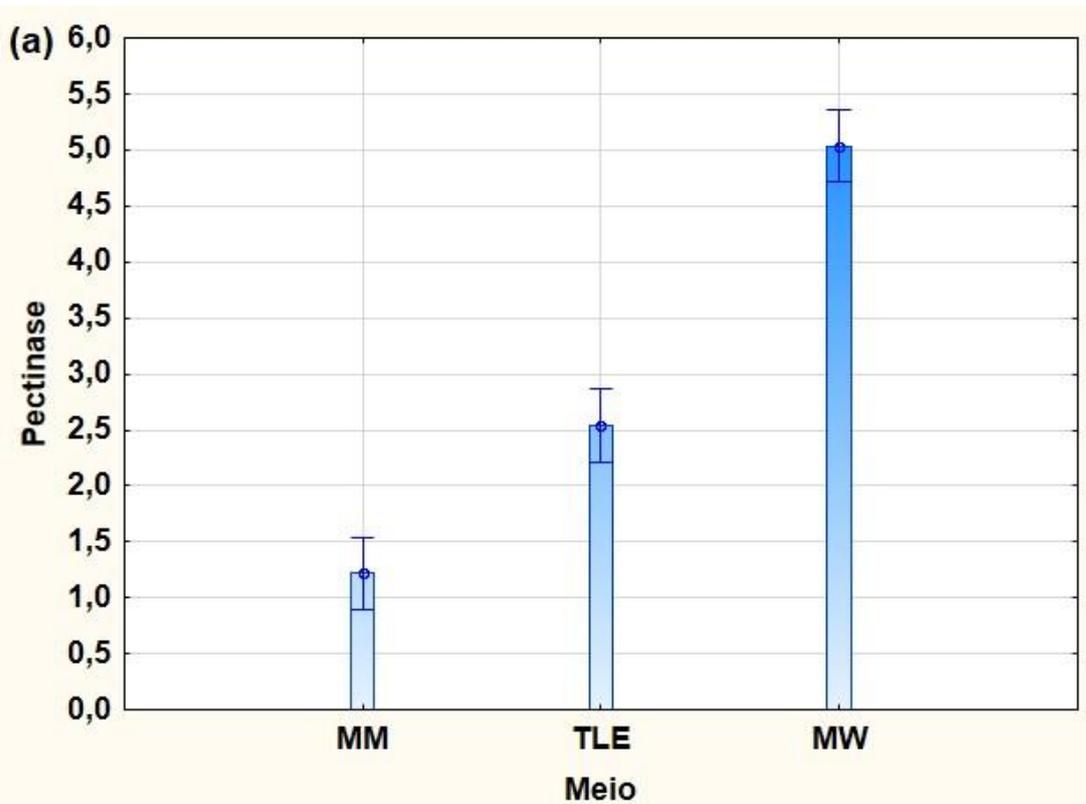


Figura 4.2. Produção de pectinases (a) e pectato liases (b) por *Clonostachys byssicola* cultivado em três diferentes meios: mínimo mineral (MM), TLE e Mandels & Weber (MW). As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.

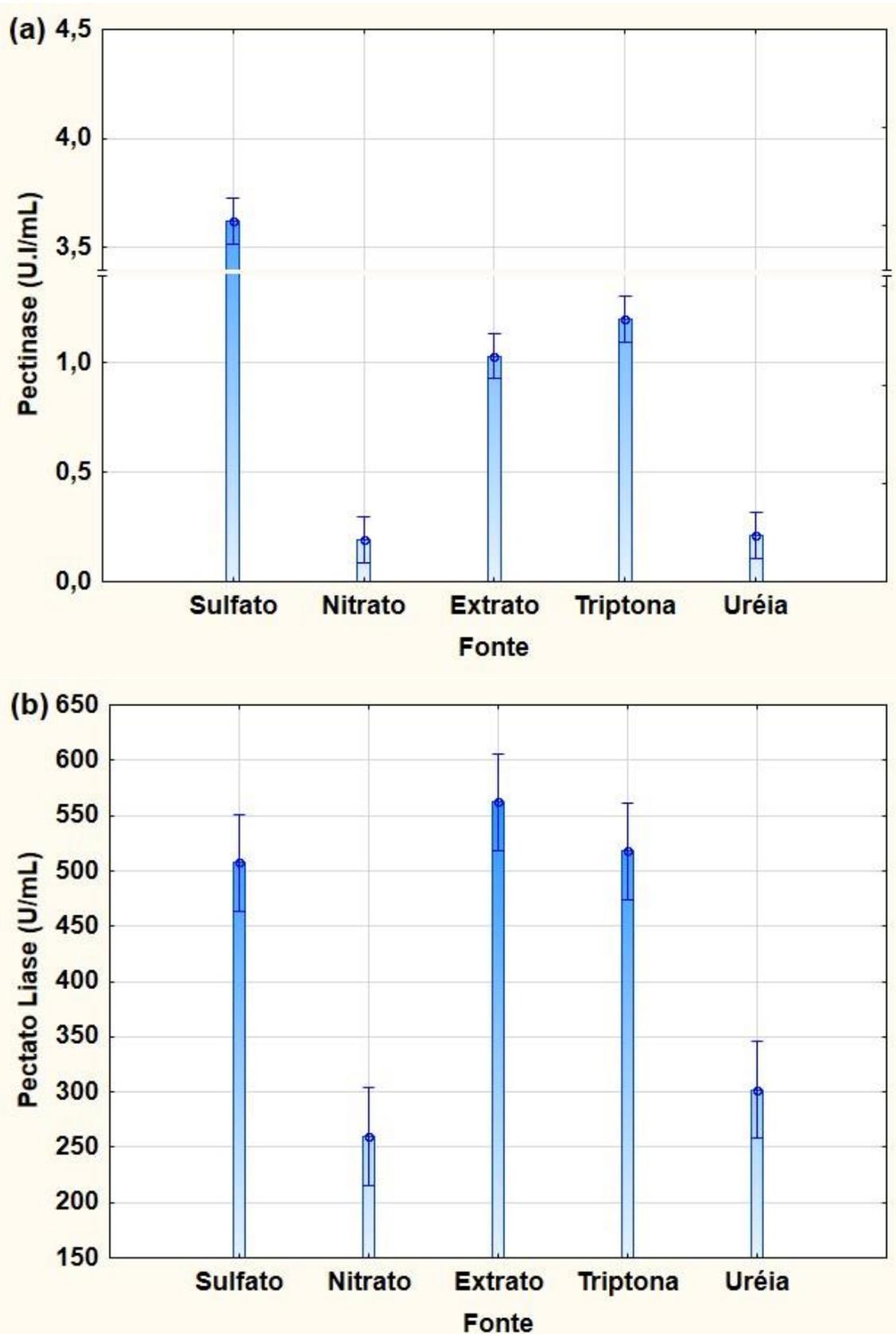


Figura 4.3. Efeito de diversas fontes de nitrogênio sobre a produção de pectinases (a) e pectato liases (b) por *Clonostachys byssicola* crescido em meio MW durante 7 dias. Fontes de nitrogênio utilizadas: sulfato de amônio, nitrato de sódio, extrato de levedura, triptona e uréia. As barras representam os intervalos de confiança a 95%.

Já Rangarajan et al., (2010) relataram que um isolado de *A. niger* foi induzido a produzir um maior título de pectinases quando cultivado em fontes nitrogenadas orgânicas. Esta tendência foi observada tanto para cultivo submerso quanto para fermentação em estado sólido, ambos utilizando casca de laranja como fonte de carbono. Sathiyaraj et al (2011) verificaram que os maiores níveis de pectinase e pectina liase foram detectados quando *Cylindrocarpon destructans* foi cultivado em meio contendo uréia como fonte de nitrogênio.

Curva de indução enzimática

Com o objetivo de monitorar a evolução dos níveis de atividade de pectinase e pectato liase, e determinar o melhor dia para produção destas enzimas, *C. byssicola* foi crescido em meio MW durante sete dias. Os valores de atividade enzimática monitorados são apresentados na Figura 4.4. A atividade de pectinase se estabilizou a partir do quarto dia, enquanto que a atividade de pectato liase aumentou durante todo o período avaliado. O aumento contínuo da atividade de pectina liase foi observado em cultivos de *A. terreus* (Martínez-Trujillo et al., 2011). Considerando a estabilização do nível de atividade de pectinase, o quarto dia de cultivo foi escolhido para as etapas posteriores do trabalho.

SDS-PAGE e Zimograma

O perfil de proteínas do extrato bruto obtido após o cultivo de *C. byssicola* durante 4 dias, bem como as pectinases presentes são mostrados na Figura 4.5. Pela análise do perfil eletroforético, verifica-se a presença de três bandas intensas de massa molecular entre 30 e 45 kDa. Essas bandas intensas coincidem com as bandas de atividade pectinolítica observada no gel corado com vermelho de rutênio. Observa-se, portanto, que as pectinases se encontram em grande abundância no secretoma de *C. byssicola* produzido em resposta à casca de laranja.

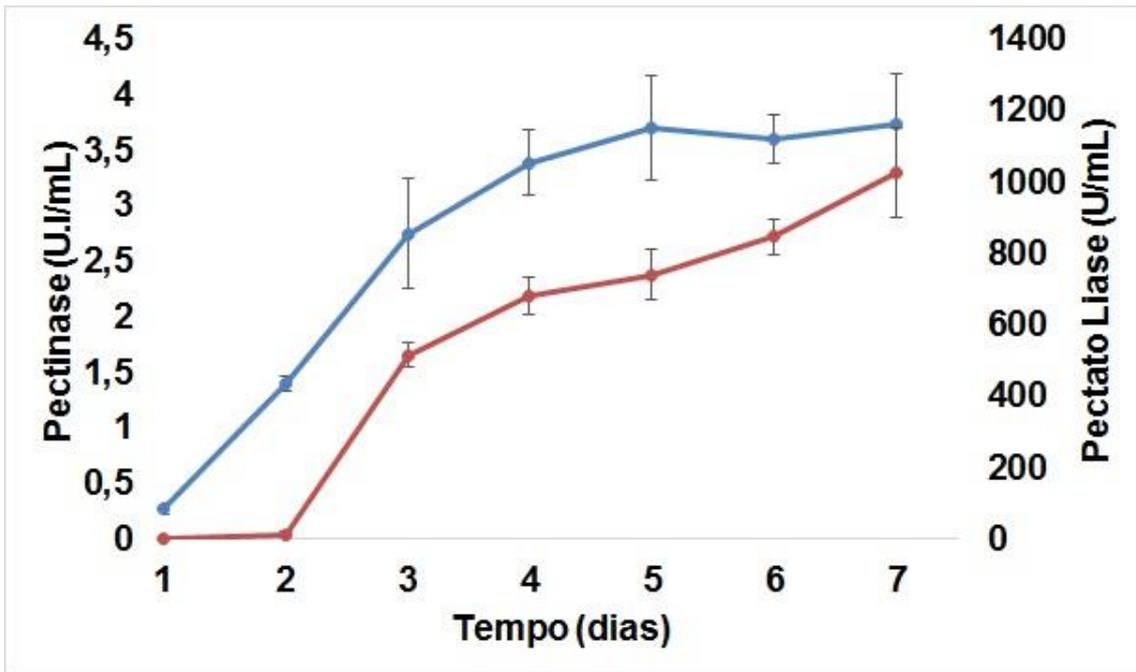


Figura 4.4. Produção de pectinases durante o crescimento de *Clonostachys byssicola* em meio MW, contendo casca de laranja como única fonte de carbono. São apresentados os níveis de atividade de pectinase (azul) e pectato liase (vermelho). As barras indicam os desvios-padrão.

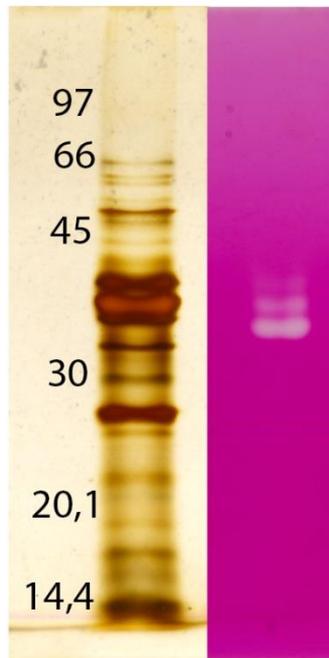


Figura 4.5. Perfil eletroforético das proteínas presentes no extrato bruto obtido após o cultivo de *C. byssicola* em meio MW contendo casca de laranja como única fonte de carbono, durante 4 dias. Os números se encontram nas posições dos marcadores moleculares. A zimografia exibindo as bandas com atividade pectinolítica é apresentada ao lado do gel.

Caracterização do secretoma

O secretoma de *C. byssicola* obtido após 04 dias de cultivo foi resolvido por meio de LC-MS/MS. Os resultados são apresentados na Tabela B.1 (Anexo B). Considerando a restringência de 2 peptídeos únicos, foram identificadas 47 proteínas, sendo a maioria delas envolvida em processos de degradação de carboidratos, conforme pode ser evidenciado pela diversidade de famílias CAZY representadas no secretoma.

O secretoma de *C. byssicola* cultivado em casca de laranja apresenta várias proteínas em comum aos secretomas avaliados no Capítulo 3 desta tese, sugerindo novamente que o fungo produz um conjunto relativamente uniforme de enzimas quando cultivado em resíduos lignocelulósicos diferentes. É possível que o fungo seja capaz de regular a quantidade de algumas dessas proteínas em resposta a uma determinada fonte de carbono, como observado para outras espécies, como *Phanerochaete carnososa* (Mahajan and Master, 2010). No entanto, outros estudos serão necessários para comprovar esta hipótese.

Uma grande diversidade de enzimas envolvidas na degradação da pectina foi identificada pela análise do secretoma. Foram identificadas duas endopoligalacturonases (GH 28, Tabela A.1) de aproximadamente 37 kDa. Esses valores estão de acordo com a massa das enzimas identificadas por SDS e zimograma (Figura 4.5), o que sugere que estas enzimas provavelmente correspondem à endopoligalacturonases. Curiosamente, uma terceira banda também foi identificada pelo zimograma, com uma intensidade menor. É possível que esta enzima corresponda à uma proteoforma de alguma das endopoligalacturonases, e sua massa maior pode ser atribuída ao fato dessa enzima ser glicosilada.

Também foram identificadas algumas pectato liases no secretoma de *C. byssicola* (Tabela A.1). As enzimas identificadas pertencem às famílias PL1 e PL3, com massas moleculares entre 24 e 35 kDa. Não foram identificadas liases que apresentam homogalacturonana I como substrato (como ramnogalacturonato liases) no secretoma. Na verdade, é possível que a diversidade de liases aumente em função do tempo de cultivo, pois como pode ser observado na Figura 4.4, o nível de atividade de pectato liase apresenta tendência de crescimento durante todo o período da curva de indução. Dessa

forma, a caracterização do secretoma obtido em outros tempos de cultivo, como 07 dias, seria interessante para verificar se a diversidade de enzimas pectinolíticas sofre alguma variação. Além das liases, enzimas relacionadas à remoção de substituintes laterais também foram identificadas, como pectinesterases (CE 8) e ramnogalacturonana acetilesterase (CE 12).

A diversidade de enzimas detectadas no secretoma produzido em resposta à casca de laranja por *C. byssicola* revela o potencial desta espécie como fonte de pectinases. O sistema pectinolítico produzido por *C. byssicola* é comparável, em termos de diversidade, ao de outras espécies convencionalmente estudadas para a produção de pectinases, como *Neurospora crassa* (Benz et al., 2014) e *A. niger* (Borin et al., 2015).

Ultrafiltração e Cromatografia

O extrato bruto obtido após o cultivo de *C. byssicola* durante 04 dias em meio MW contendo casca de laranja como única fonte de carbono foi concentrado por ultrafiltração em membrana com ponto de corte de 50 kDa. Os resultados de atividade enzimática são apresentados na Tabela 4.1, e verifica-se que o maior valor de atividade de pectinase foi observado na fração concentrada. Esta fração, portanto, foi utilizada nas etapas cromatográficas. Curiosamente, a maior parte da atividade pectinolítica ficou retida na fração concentrada, mesmo que as três pectinases detectadas através do zimograma (Fig. 4.5) apresentem massa inferior a 50 kDa. É provável que as pectinases estejam interagindo com outras proteínas do extrato bruto, o que contribuiu para a retenção dessas enzimas na fração concentrada.

Tabela 4.4 Ultrafiltração do extrato bruto em membrana de 50 kDa. Os valores de atividade são apresentados juntamente com os respectivos desvios-padrão.

Fração	Volume	Atividade (U.I/mL)	Atividade Total
Extrato bruto inicial	350 mL	1,84±0,21	644 U.I
Concentrado	40 mL	9,58±1,04	383 U.I
Ultrafiltrado	310 mL	0,44±0,055	136 U.I

O extrato bruto concentrado foi aplicado em coluna de troca aniônica SPFF. O cromatograma é apresentado na Figura 4.6. Verifica-se que foram separados dois picos contendo atividade pectinolítica, sendo um pico eluído antes do gradiente (fração SPPG), e o outro eluído durante o gradiente (fração SPG). As frações com atividade pectinolítica eluídas durante o gradiente não co-eluíram com as outras atividades de mananase, xilanase e CMCase. Esta fração, portanto, apresenta grau de pureza suficiente para aplicações industriais, bem como para as demais etapas de purificação.

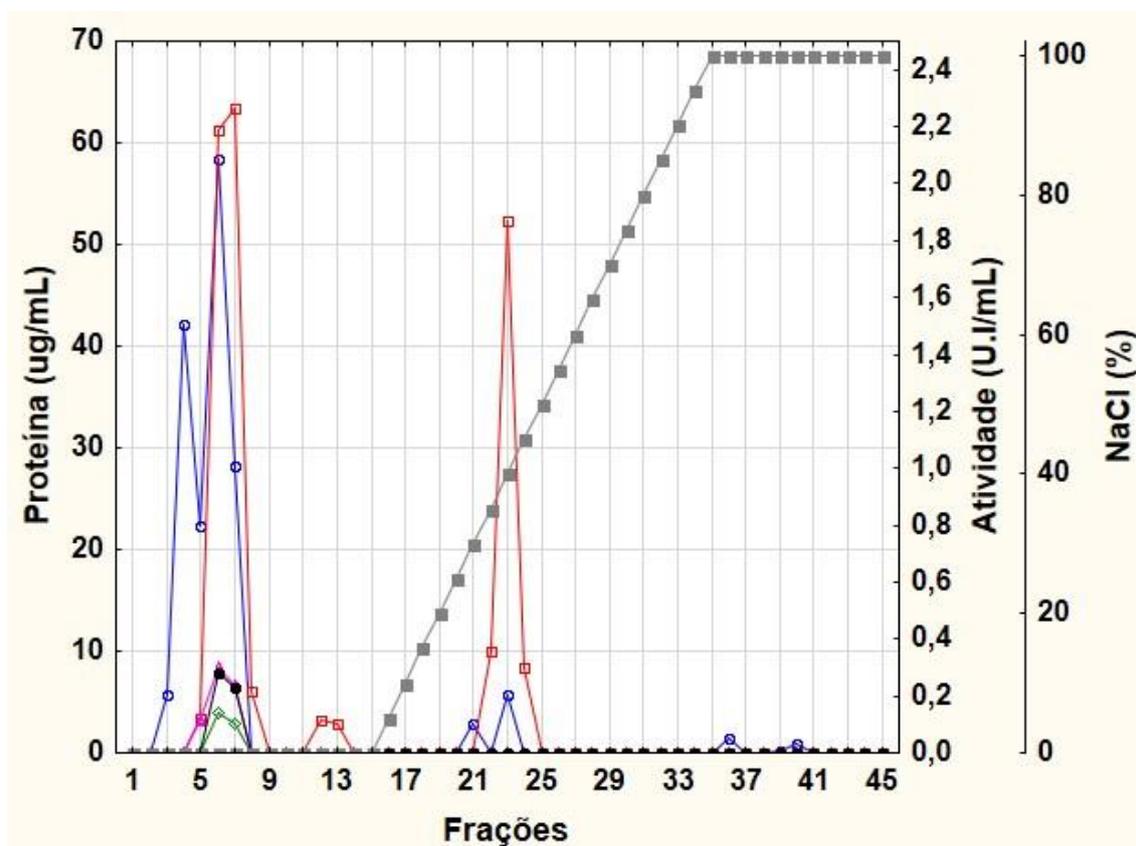


Figura 4.6. Cromatograma do extrato bruto concentrado aplicado em coluna SPFF. Foram aplicados 5 mL de amostra, e coletados 5 mL por fração. A cromatografia foi realizada com fluxo de 30 mL/h, e o gradiente foi estabelecido com tampão contendo NaCl 1 M. São apresentados os valores de concentração total de proteínas (linha azul), atividades de pectinase (linha vermelha), mananase (linha preta), xilanase (linha rosa) e CMCase (linha verde). O gradiente é representado pela linha cinza.

Com o intuito de avaliar o potencial de aplicação da pectinase semi-purificada obtida durante o gradiente da cromatografia em SPFF (Figura 4.6), a fração 23 foi dialisada contra água destilada, e após a dessalinização, a atividade pectinolítica foi caracterizada quanto ao efeito de temperatura e pH. Os resultados são mostrados na Figura 4.7. Pela análise dos dados, verifica-se que a enzima parcialmente purificada apresentou atividade máxima a 50°C, e na

faixa de pH entre 4,5 e 6. Nas faixas de pH neutra e alcalina, houve decréscimo considerável na atividade pectinolítica, exceto em pH Tris-HCl 7,5, sendo que este resultado pode ser devido a um efeito da substância utilizada no tampão, uma vez que o resultado foi diferente quando o tampão fosfato foi utilizado no mesmo pH. Os resultados encontrados para esta pectinase parcialmente purificada são semelhantes às propriedades de outras pectinases já descritas. Por exemplo, uma poligalacturonase purificada a partir de cultivos de *Mucor circinelloides* apresentou atividade máxima a 42°C, e pH 5,5 (Thakur et al., 2010), e uma pectinase produzida por *Aspergillus niger* crescido em casca de laranja apresentou atividade máxima a 55°C, e pH 7,0 (Ahmed et al., 2016).

O perfil de atividade da pectinase parcialmente purificada revela seu potencial de aplicação para a clarificação e redução da viscosidade de sucos de frutas levemente ácidos. De fato, a aplicação de enzimas com propriedades físico-químicas semelhantes tem sido relatada. Cheng et al., (2017) avaliaram o potencial de aplicação de uma endopoligalacturonase produzida por *P. oxalicum* para facilitar a extração de sucos de manga, mamão e banana. Esta endopoligalacturonase apresenta atividade máxima em pH 5,5, o que a torna adequada para aplicação nos sucos dessas frutas, que apresentam pH na faixa de 4,5-5,1. O tratamento enzimático aumentou o rendimento dos sucos, bem como possibilitou a redução da viscosidade e clarificação. O potencial de aplicação da pectinase parcialmente purificada a partir do extrato bruto de *C. byssicola* para tratamento de sucos e polpas de frutas tropicais será avaliado posteriormente.

A fração parcialmente purificada de pectinase foi aplicada em ConA sefarose. O cromatograma é apresentado na Figura 4.8. Observa-se a presença de dois picos com atividade de pectinase, que eluíram antes e durante o gradiente de metilglicose 0,5 M. Estes resultados indicam a presença de duas proteoformas distintas na fração eluída durante a cromatografia em SPFF, sendo uma proteoforma glicosilada e a outra aparentemente sem glicosilações.

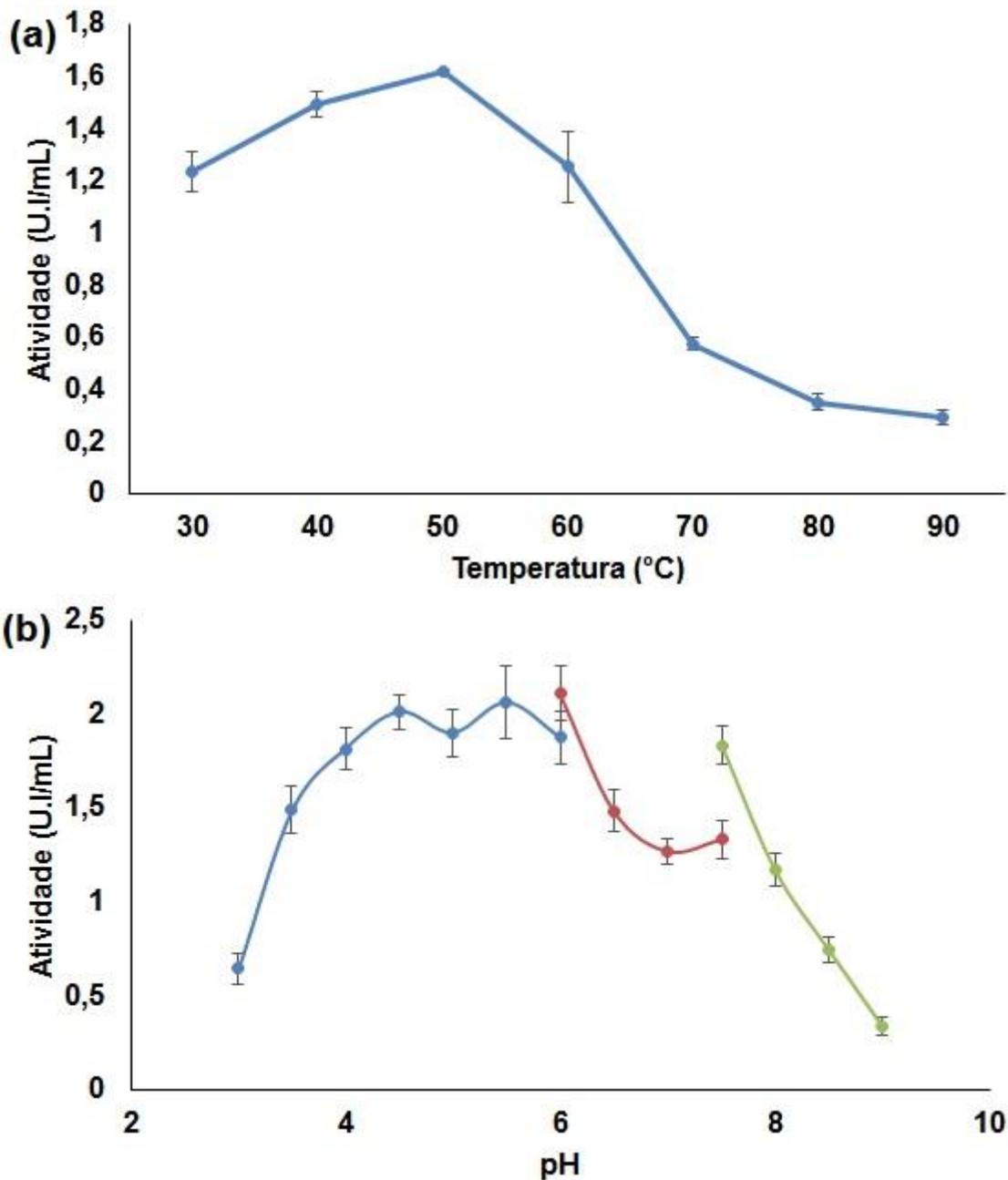


Figura 4.7. Efeito da temperatura (a) e do pH (b) sobre a pectinase parcialmente purificada após cromatografia em SPFF. As barras representam os respectivos desvios-padrão. Para o efeito do pH, foram utilizados tampões a base de acetato (linha azul), fosfato (linha vermelha) e Tris (linha verde).

Com o intuito de avaliar a evolução da purificação das pectinases, amostras do extrato bruto concentrado, e das frações obtidas nas cromatografias em SPFF e ConA foram precipitadas em acetona, e resolvidas por meio de SDS-PAGE. O perfil eletroforético das amostras é apresentado na Figura 4.9. A cromatografia em SPFF promoveu uma considerável remoção de proteínas contaminantes quando comparada a fração eluída durante o gradiente (SPG) ao extrato bruto inicial (C50). Ainda, a aplicação desta fração em coluna contendo

resina ConA sefarose permitiu a remoção de outras proteínas contaminantes, de forma que as proteínas remanescentes apresentam uma diferença de massa molecular maior quando comparada com o perfil da fração SPG. As frações CPG e CG, portanto, podem ser aplicadas em colunas de exclusão molecular nas etapas posteriores de purificação.

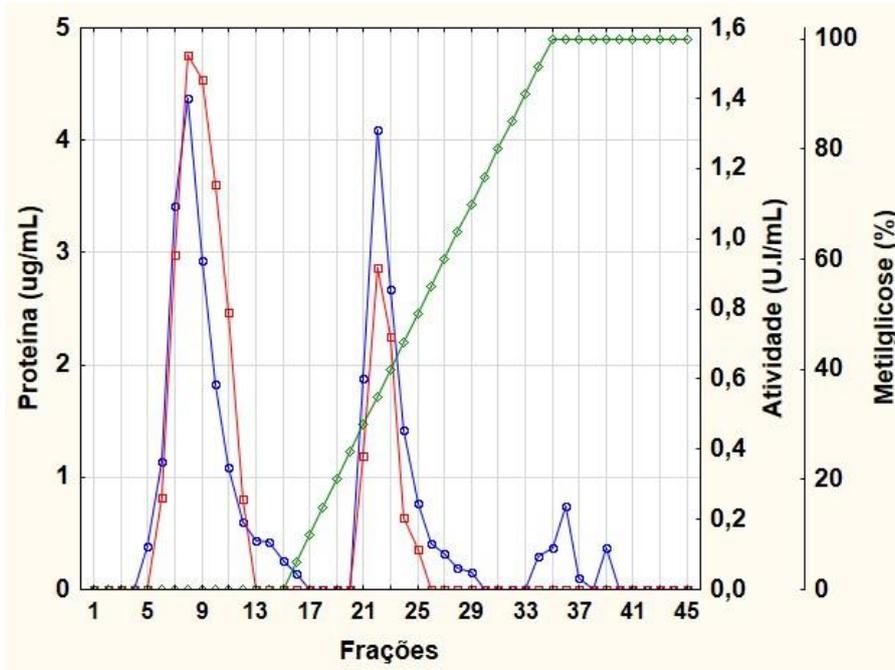


Figura 4.8. Cromatograma da fração contendo a pectinase parcialmente purificada aplicada em coluna contendo ConA sefarose. A cromatografia foi realizada com fluxo de 30 mL/h, e o gradiente foi estabelecido com tampão contendo metilglicose 0,5 M. São apresentados os valores de concentração total de proteínas (linha azul) e atividade de pectinase (linha vermelha). O gradiente é representado pela linha verde.

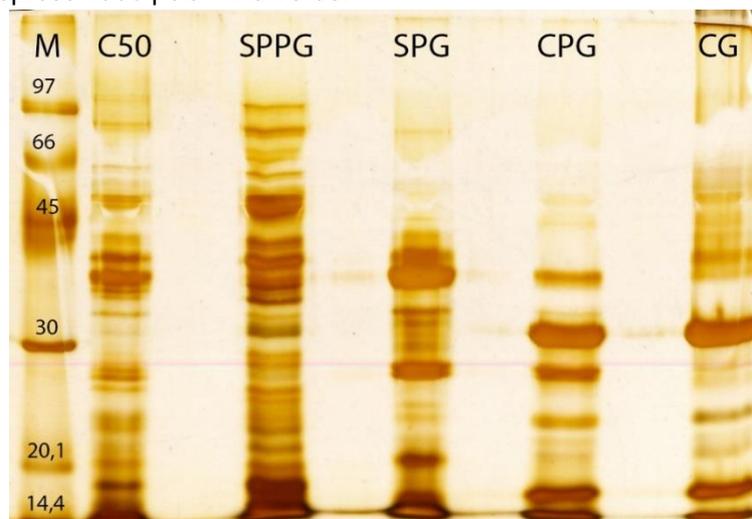


Figura 4.9. Gel de SDS-PAGE ilustrando o perfil de proteínas ao longo das etapas de purificação das pectinases produzidas por *Clonostachys byssicola*: fração concentrada da ultrafiltração (C50); frações coletadas antes (SPPG) e durante (SPG) o gradiente na cromatografia em SPFF; e frações coletadas antes (CPG) e durante (CG) o gradiente da cromatografia em ConA sefarose. A primeira coluna corresponde ao marcador molecular.

Identificação de uma pectinase parcialmente purificada por LC-MS/MS

A banda mais intensa da fração SPG, que apresenta massa molecular na faixa de 30-45 kDa (Figura 4.9) foi excisada do gel, submetida à digestão *in gel* com tripsina, e aplicada em LC-MS/MS para identificação. O resultado completo da identificação é apresentado na tabela B.2 (Anexo B). Uma endopoligalacturonase (Acesso BN869_T0000016_1) foi a proteína identificada com o maior número de peptídeos e conclui-se, portanto, que a banda predominante na fração parcialmente purificada após cromatografia em SPFF corresponde à esta enzima. A sequência correspondente ao transcrito predito, obtida a partir do genoma disponibilizado de *C. rosea*, é apresentada a seguir (Figura 4.10).

```
5'AAGCAAGACCTTTTCTCTACATTCCGATAGTCATAATGGCTAGATTGCTACTATCTACCTACTCGCCGTTGCGGCTACTGGC
ATCATCGCCAGCCCAGCGCCCCCTGCTGTTACCCAGGCTCCTAAACTTGAAGAGCGAGCAACTACTTGCACCTTCTCTGGATC
CTCCGGGGCAGCTAGCGCAAGCAAGTCGCAGGCATCCTGTGCCACTATCGTGCTCTCTAATGTCGCTGTTCCGTCTGGGACA
ACTCTTGATCTAAGCAACCTAAACGATGGCACACATGTCATTTTTCAGGGCACTACAACCTGGGGCTACTCCGAATGGTCTGG
CCCTCTATTGCAGATTCAGGGAAACAGCATCACCGTGAAGGGGCTCTGGCGCAGTTCTGAATCCTGATGGAGCTCGCTG
GTGGGATGAAAAGGGCGGCAGCGGTGGCAAGACAAAACCGAAGTTCTTCGCCGCACACAACTCACCAACTCTGCCATCA
ACAACATTCACATCACAATACTCCTGTCCAGGCACCTAGCATCAACGGCGTGAATGGCCTGACTATTGCCAACATGATAATAG
ACAATGCTGCTGGTGACAGCGGTGGCGGTAAGAACACGGACGCTTTTGATATCGGGGATAGTACTGGGGTTACCATCACTG
GCGCTCAGGTCCACAACCAAGATGATTGTGGCAGTCAACTCTGGAAGCAACATCATCTTTTCAGGCGGCCTCTGTTCCGG
TGGCCACGGCCTGTCAATTGGCAGCGTTGGTGGTTCGACTAACAACGTGGTTTCCAATGTTACCTTTAAAGATAGCACCGTTC
AAAATTCCGTCCAAGCTATCCGTGTAAGACTGTCGCCGGCACAACAGTTCTGTGACTGGTGACATATTCGGGGCTCAC
GTTGAAAAACATCAGAAATGTTGTTCTTATCGAGCAGAATTACAACGGAGGAGATCTCAAAGGTGATCCCACAACCTGGC
GTGCCCATCACTGGCCTGACGGTGGAGAATATCACTGGTGGGGGAGGTGTCGCTTCTGGAGGATACAATGTCGTCGTGGTC
TGCGGTAGTGCTCTTGTCTGGCTGGACTTGGTCTAATGTTGTGATTACTGGAGGCACCAAGGTCTACAGCTGTCAGAATA
GCCCCGTCCAGTGCTCCTAGAGAACAAAGGCATATTCTATTGCACTCGACCTGGAAGTAAATTAGTTGAAATCAATGG
AGTGCCGGATAA3'
```

Figura 4.10. Transcrito predito para a endopoligalacturonase (BN869_T0000016_1) identificada a partir da fração semi-purificada após cromatografia em SPFF. As sequências em amarelo representam regiões não-transcritas. As sequências destacadas em verde correspondem ao peptídeo sinal.

O transcrito predito para a endopoligalacturonase apresenta-se composto por uma região não-transcrita (UTR) em cada uma das extremidades da sequência, além de um peptídeo sinal composto por 19 aminoácidos. No planejamento do experimento de expressão, todas essas regiões foram desconsideradas durante a etapa de desenho dos primers, uma vez que não seria possível saber se essas UTR's poderiam atrapalhar a expressão do gene em *P. pastoris*. Além disso, optou-se por usar o fator de secreção α presente no pGAPZ α , pois este já é um fator reconhecido pela levedura.

Após a identificação do transcrito predito, e o desenho dos primers apropriados para a amplificação, foi realizada a PCR para a pesquisa do

transcrito codificante para a endopoligalacturonase de interesse na amostra de cDNA. Conforme pode ser avaliado pela Figura 4.11, foi amplificada uma única banda, com tamanho estimado em cerca de 1200 pares de base (1,2 kpb). Este tamanho é compatível com o tamanho da sequência codificadora da endopoligalacturonase (Figura 4.10), sendo possível concluir que foi possível amplificar o transcrito da enzima produzida por *C. byssicola* a partir dos primers desenhados com base na sequência da enzima obtida a partir do genoma de *C. rosea*.

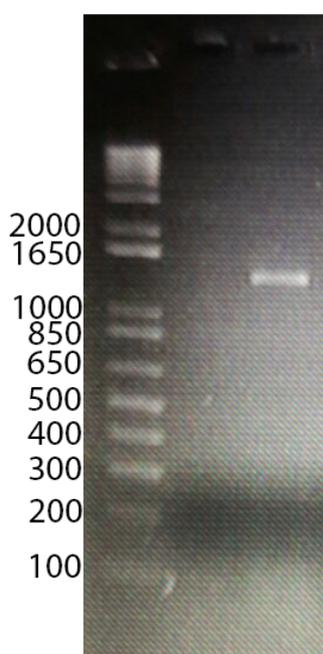


Figura 4.11. Produto da PCR realizada utilizando-se os primers específicos para a endopoligalacturonase parcialmente purificada após cromatografia em SPFF e o cDNA obtido após o cultivo de *Clonostachys byssicola* em casca de laranja durante 4 dias.

Após o tratamento do produto de PCR com as enzimas de restrição, o amplicon foi ligado ao vetor pGAPZαA, e o plasmídeo contendo o inserto foi utilizado para a transformação de células termocompetentes de *E. coli* XL 10 *Gold*. Das colônias transformadas, 04 foram selecionadas para a extração de DNA plasmidial. A Figura 4.12(a) apresenta os plasmídeos obtidos após extração dos clones selecionados. Verifica-se que três dos clones apresentam tamanho superior ao controle negativo (C-, o plasmídeo sem o inserto), enquanto apenas o DNA plasmidial extraído do clone 5 (C5) apresentou tamanho semelhante ao controle negativo, indicando que este clone foi transformado com o plasmídeo desprovido de inserto. Para confirmar a presença do inserto nos

plasmídeos extraídos das colônias, amostras de DNA plasmidial foram tratadas com *EcoRI* e *XbaI*. Os resultados são apresentados na Figura 4.12(b) e, conforme esperado, observa-se que nas amostras de todos os clones, à exceção do clone 5, há a presença de uma banda de tamanho menor, correspondente ao inserto, liberada após o tratamento com as nucleases de restrição.

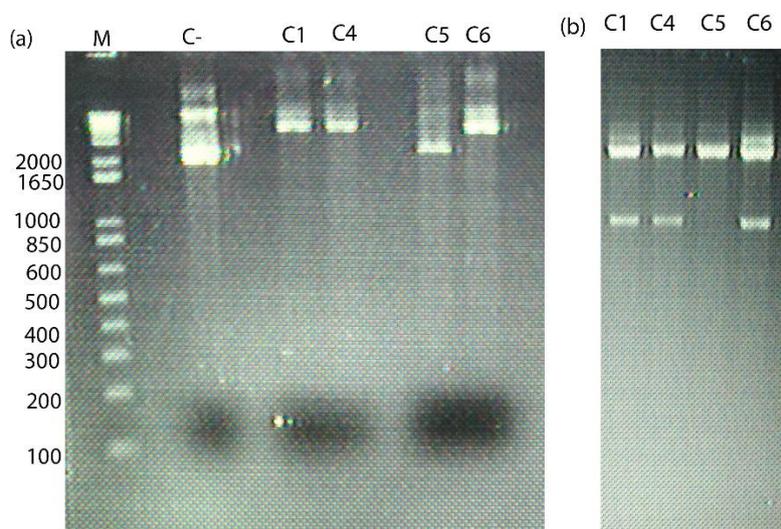


Figura 4.12. Perfil das amostras de DNA plasmidial extraídas de 4 clones (C1, C4, C5 e C6) de *Escherichia coli* XL10 Gold selecionados após a transformação. São apresentados (a) o tamanho dos plasmídeos obtidos em comparação ao vetor sem inserto (C-) e (b) os produtos de digestão obtidos após o tratamento das amostras com *EcoRI* e *XbaI*.

O sequenciamento das amostras obtidas após a PCR com os primers específicos para o vetor pGAPZ α A mostrou que o inserto nos clones C1, C4 e C6 foi corretamente inserido no vetor (dados não mostrados). Durante o cultivo para a obtenção de massa de células destinadas à extração de DNA plasmidial, o clone C4 apresentou um crescimento aparente mais vigoroso. Em função dessa característica, este clone foi selecionado para a extração de DNA plasmidial em escala maior, de forma a se obter material suficiente para a transformação de *P. pastoris* X-33.

Após a transformação da levedura, foram obtidos 16 clones transformados, que foram submetidos à confirmação de seleção através da repicagem para uma nova placa contendo o antibiótico de seleção zeocina. As colônias dos clones obtidos foram pesquisadas quanto à presença do inserto, através de PCR com os primers específicos para a sequência da endopoligalacturonase. Os resultados são apresentados na Figura 4.13. Verifica-se que a maioria dos clones apresentou banda com tamanho característico do inserto.

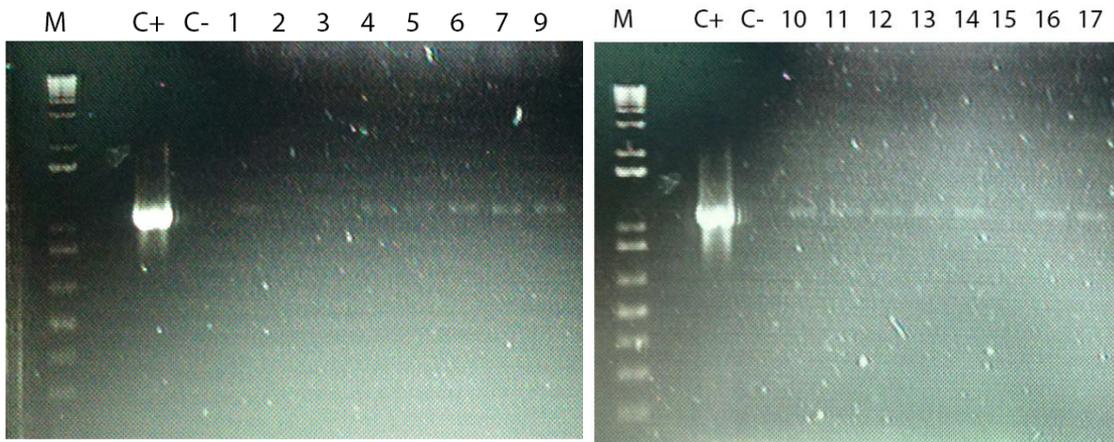


Figura 4.13. Resultado da PCR das colônias transformadas de *Pichia pastoris* X-33 utilizando os primers específicos para o inserto. C+ e C- representam o plasmídeo pGAPZαA com e sem o inserto, respectivamente.

Com o intuito de verificar a produção de pectinases pelos clones transformados, todas as 16 colônias foram semeadas em placa contendo ágar YNB com 10% de glicerol, e 1% de ácido poligalacturônico. Após 5 dias de crescimento, as colônias foram avaliadas quanto à produção e secreção de endopoligalacturonase através da formação de halos característicos de hidrólise enzimática. Conforme pode ser evidenciado pela análise da Figura 4.14, não houve formação de halo de degradação enzimática por nenhum dos clones pesquisados.

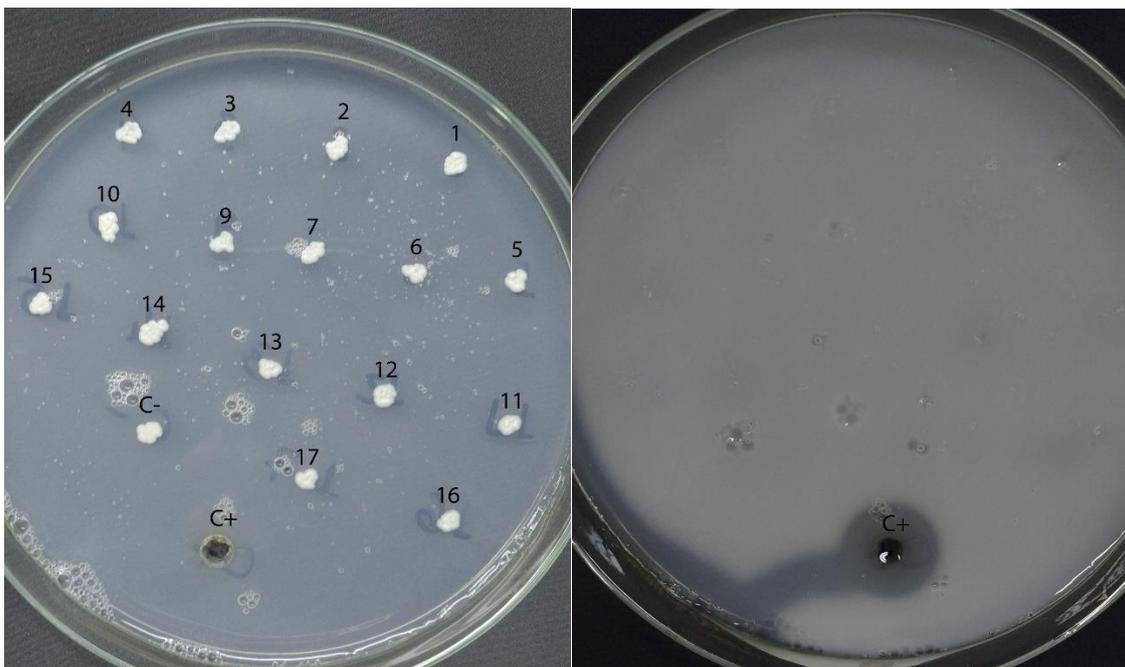


Figura 4.14. Teste de halo de atividade pectinolítica para os isolados transformados de *Pichia pastoris* X-33.

Alguns clones foram cultivados em meio líquido YNB contendo 10% de glicerol como fonte de carbono, com o intuito de confirmar os resultados obtidos pelo teste de halo de degradação em placa. Os clones 7, 9, 13, 14 e 17, além do controle negativo, foram cultivados durante 70 horas, e nesse período a densidade ótica a 600 nm (OD 600 nm) e os níveis de atividade pectinolítica foram monitorados. Os valores de OD registrados são apresentados na Figura 4.15. Os resultados do cultivo em placa foram corroborados no cultivo líquido: durante o período de crescimento monitorado, não foram detectados níveis de atividade pectinolítica.

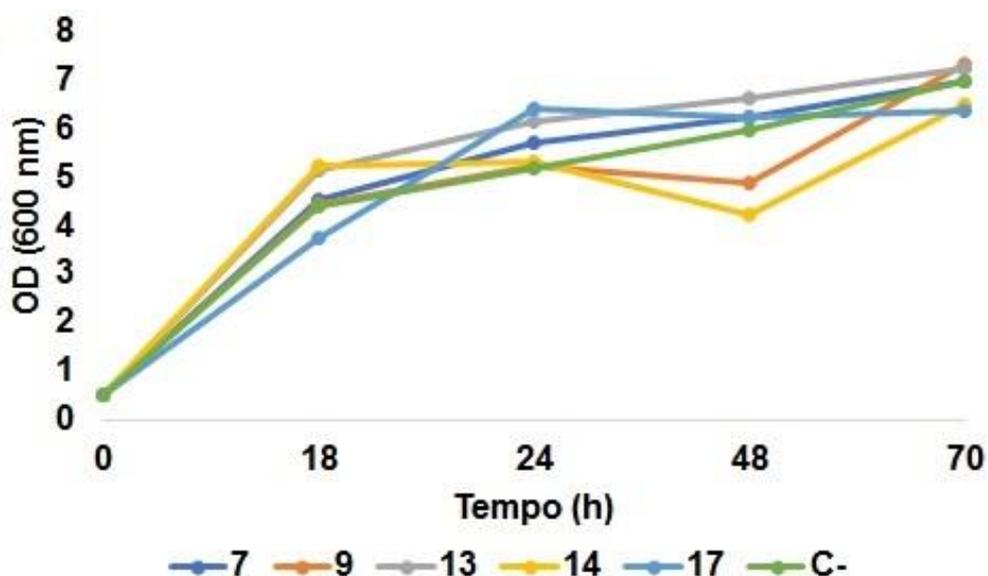


Figura 4.15. Crescimento dos isolados 7, 9, 13, 14 e 17, e do controle negativo (C-), expresso em termos de OD (600 nm), cultivados em meio YNB contendo glicerol 10% como fonte de carbono.

Após 70 horas de incubação, todo o meio de cultivo foi coletado e centrifugado. Foram precipitadas alíquotas tanto do sobrenadante quanto do precipitado de células lisado, e as proteínas obtidas foram avaliadas por meio de SDS-PAGE. Os resultados são apresentados na Figura 4.16. Observa-se que o perfil protéico do sobrenadante (Figura 4.16(a) e do precipitado de células (Figura 4.16 (b) não apresenta diferença quando as amostras dos clones são comparadas ao controle negativo. Esta etapa foi realizada para verificar se a endopoligalacturonase não estava presente no sobrenadante ou no citoplasma, ou se uma forma inativa da enzima estivesse presente. Pelas imagens apresentadas, a primeira hipótese parece se confirmar.

A ausência de secreção de pectinases será investigada na próxima etapa do trabalho. A ausência de atividade pectinolítica nos cultivos de *P. pastoris* pode ser causada por diversos fatores. É possível que a enzima expressa esteja sendo degradada por enzimas proteolíticas. A atuação das proteases pode ocorrer após a secreção das proteínas de interesse, ou ainda durante o transporte dessas proteínas para o meio extracelular (Ahmad et al., 2014). Nesse caso, será necessário o uso de linhagens de *P. pastoris* com baixa atividade proteolítica, ou a adição de inibidores de protease específicos. Ainda, o DNA genômico total dos clones será extraído, de forma a confirmar a integração do vetor ao genoma dos clones. Outra possibilidade a ser abordada será o cultivo, em escala maior, de alguns clones, de forma a obter volume considerável de sobrenadante (pelo menos 100 mL), o qual será concentrado por ultrafiltração e avaliado quanto à atividade pectinolítica. Dessa forma, será possível identificar níveis baixos de atividade enzimática. Além disso, será realizada uma nova transformação de *P. pastoris*, dessa vez utilizando duas enzimas para a linearização dos plasmídeos.

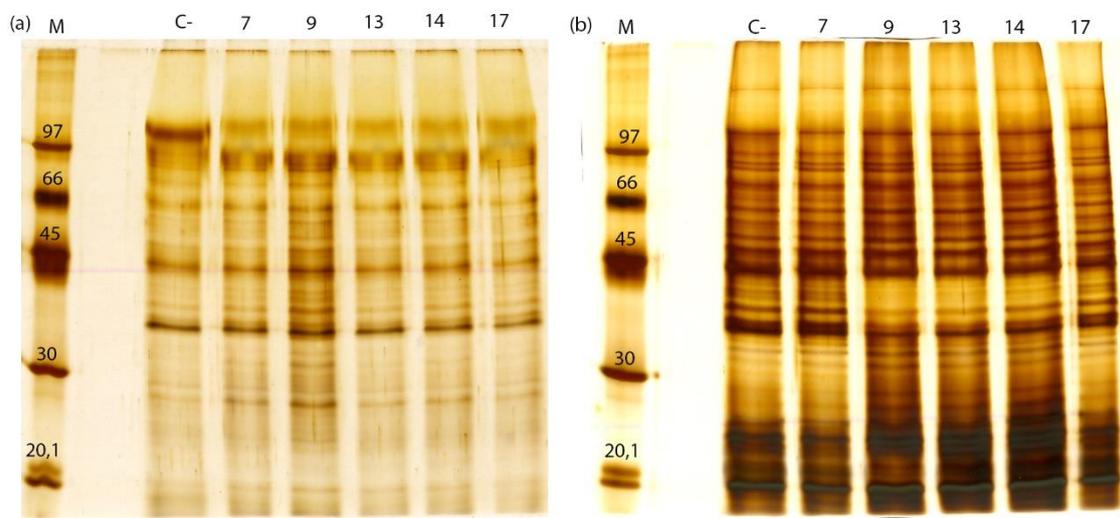


Figura 4.16. Perfil proteico das amostras coletadas no último ponto da curva de crescimento de alguns dos clones transformados de *Pichia pastoris* crescidos em YNB contendo 10% de glicerol. São apresentados os perfis do sobrenadante (a) e das proteínas extraídas do precipitado de células (b).

Conclusões

O isolado de *C. byssicola* utilizado neste trabalho apresentou potencial para a produção de pectinases e pectato liases. O fungo apresentou produção

máxima de pectinases a partir do quarto dia de cultivo, enquanto que o nível de pectato liases aumentou durante todo o período avaliado. O secretoma de *C. byssicola* produzido sob indução por casca de laranja apresentou uma grande diversidade de enzimas pectinolíticas, incluindo endopoligalacturonases, pectato liases, e diversas enzimas que atuam na remoção de substituintes laterais, em especial esterases. Uma fração com atividade pectinolítica parcialmente purificada apresentou propriedades físico-químicas compatíveis para aplicação, por exemplo, no clareamento de sucos de frutas moderadamente ácidos. A partir dessa fração, foi possível identificar uma endopoligalacturonase. Os trabalhos com a expressão heteróloga dessa enzima em *Pichia pastoris* foram iniciados, sendo possível amplificar a sequência codificante a partir de uma biblioteca de cDNA.

Perspectivas

Pretende-se prosseguir com a purificação das pectinases e iniciar a purificação das pectato liases, de forma a caracterizar as enzimas purificadas quanto aos parâmetros cinéticos, bem como caracterizar a estrutura das enzimas por métodos biofísicos, como fluorescência e dicroísmo circular.

Neste estudo, o potencial de *C. byssicola* como uma nova fonte de enzimas pectinolíticas foi descrito pela primeira vez. Foram detectados títulos consideráveis de pectinases e pectato liases quando o fungo foi cultivado em meio MW com casca de laranja como única fonte de carbono. No entanto, os cultivos foram realizados apenas em pequena escala, utilizando frascos erlenmeyers. É extremamente importante a avaliação da performance de *C. byssicola* em produzir estas enzimas pectinolíticas em maior escala, visando ampliar o seu potencial e utilização. Dessa forma, pretende-se otimizar as condições de cultivo do fungo em fermentador de 5 L, já disponível no laboratório, utilizando metodologia de planejamentos fatoriais. Neste trabalho, foi possível fazer uma otimização inicial quanto à escolha do meio de cultura e da fonte de nitrogênio mais apropriado para a produção de enzimas. No entanto, o planejamento fatorial permitirá avaliar um número maior de parâmetros, bem como a interação entre eles, sobre a produtividade do fungo.

O potencial das enzimas produzidas neste trabalho para a degradação de substratos ricos em pectina precisa ser avaliado. Dessa forma, será necessário avaliar a hidrólise dos mais diversos substratos, como resíduos de frutas cítricas, pectina de maçã e pectina de beterraba, de forma a avaliar a performance das enzimas de *C. byssicola* na hidrólise da pectina presente nesses substratos, e confirmar seu potencial de aplicação.

A análise das frações obtidas após cromatografia em ConA sefarose revelou um número menor de proteínas, e com diferenças de massa molecular maiores em relação às frações obtidas em SPFF. Com isso, já é viável a aplicação destas frações em coluna de exclusão molecular. A purificação das pectinases prosseguirá em colunas sefacril S-100 e/ou S-200, acopladas à sistema de FPLC (Akta Purifier, GE Healthcare, Suécia).

A expressão das pectinases produzidas por *C. byssicola* permitirá a obtenção de grandes concentrações dessas enzimas. Além disso, como a expressão está sendo feita em *P. pastoris*, as enzimas obtidas poderão ser prontamente aplicadas na transformação de alimentos, visto que esta espécie é reconhecida como segura para aplicação na indústria alimentícia. Como não foi detectada atividade pectinolítica nos cultivos, nem banda de proteína com massa próxima à massa esperada para a endopoligalacturonase, será necessário fazer uma nova transformação de X-33, ou até mesmo utilizar outras cepas.

Referências

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5301–5317. doi:10.1007/s00253-014-5732-5
- Ahmed, I., Zia, M.A., Hussain, M.A., Akram, Z., Naveed, M.T., Nowrouzi, A., 2016. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 9, 148–154. doi:10.1016/j.jrras.2015.11.003
- BCC Research. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications (Report Highlights). 2012. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html?tab=toc> Acesso em 10/12/2013.
- Benz, P.J., Chau, B.H., Zheng, D., Bauer, S., Glass, N.L., Somerville, C.R., 2014. A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in

- Neurospora crassa reveals carbon source-specific cellular adaptations. *Mol. Microbiol.* 91, 275–299. doi:10.1111/mmi.12459
- Bischoff, K.M., Shi, L., Kennelly, P.J., 1998. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 260, 1–17. doi:10.1006/abio.1998.2680
- Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A., Villa, T.G., 1994. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 40, 974–977. doi:10.1139/m94-155
- Borin, G.P., Sanchez, C.C., De Souza, A.P., De Santana, E.S., De Souza, A.T., Leme, A.F.P., Squina, F.M., Buckeridge, M., Goldman, G.H., De Castro Oliveira, J.V., 2015. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS One* 10, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0129275
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Cheng, Z., Chen, D., Wang, Q., Xian, L., Lu, B., Wei, Y., Tang, H., Lu, Z., Zhu, Q., Chen, Y., Huang, R., 2017. Identification of an acidic endopolygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028 and its broad use in major tropical and subtropical fruit juices production. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 665–672. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.01.013
- Crowell, A.M.J., Wall, M.J., Doucette, A.A., 2013. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. *Anal. Chim. Acta* 796, 48–54. doi:10.1016/j.aca.2013.08.005
- Cruickshank, R.H., Wade, G.C., 1980. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 107, 177–181. doi:10.1016/0003-2697(80)90508-4
- FAO. *FAOSTAT Agriculture Data*. 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 10 out. 2013.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S., Mische, S.M., 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601–605. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(19990301)20:3<601::AID-ELPS601>3.0.CO;2-6
- Gummadi, S.N., Panda, T., 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - A REVIEW. *Process Biochem.* 38, 987–966.
- IBGE, 2016. *Produção Agrícola Municipal*. Rio de Janeiro.
- Jurick, W.M., Vico, I., Gaskins, V.L., Peter, K.A., Park, E., Janisiewicz, W.J., Conway, W.S., 2012. Carbon, nitrogen and pH regulate the production and activity of a polygalacturonase isozyme produced by *Penicillium expansum*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 45, 1101–1114. doi:10.1080/03235408.2012.657893
- Karlsson, M., Durling, M.B., Choi, J., Kosawang, C., Lackner, G., Tzelepis, G.D.,

- Nygren, K., Dubey, M.K., Kamou, N., Levasseur, A., Zapparata, A., Wang, J., Amby, D.B., Jensen, B., Sarrocco, S., Panteris, E., Lagopodi, A.L., Pöggeler, S., Vannacci, G., Collinge, D.B., Hoffmeister, D., Henrissat, B., Lee, Y.H., Jensen, D.F., 2015. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *clonostachys rosea*. *Genome Biol. Evol.* 7, 465–480. doi:10.1093/gbe/evu292
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 215–27.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Li, P.J., Xia, J.L., Shan, Y., Nie, Z.Y., Su, D.L., Gao, Q.R., Zhang, C., Ma, Y.L., 2014. Optimizing Production of Pectinase from Orange Peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 Using Response Surface Methodology. *Waste and Biomass Valorization* 6, 13–22. doi:10.1007/s12649-014-9317-4
- Mahajan, S., Master, E.R., 2010. Proteomic characterization of lignocellulose-degrading enzymes secreted by *Phanerochaete carnosae* grown on spruce and microcrystalline cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 1903–1914. doi:10.1007/s00253-010-2516-4
- Martínez-Trujillo, A., Arreguín-Rangel, L., García-Rivero, M., Aguilar-Osorio, G., 2011. Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 202–209. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03096.x
- Minussi, R.C., Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O., 1997. Methylxanthines as inducers of pectin lyase in *penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 369–372. doi:10.1038/sj.jim.2900389
- Prasanna, V., Prabha, T.N., Tharanathan, R.N., 2007. Fruit ripening phenomena-an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 1–19. doi:10.1080/10408390600976841
- Rangarajan, V., Rajasekharan, M., Ravichandran, R., Sriganesh, K., Vaitheeswaran, V., 2010. Pectinase Production from Orange Peel Extract and Dried Orange Peel Solid as Substrates Using *Aspergillus niger*. *Int. J. Biotechnol. Biochem.* 6, 445–453.
- Sharma, N., Rathore, M., Sharma, M., 2013. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 45–60. doi:10.1007/s11157-012-9276-9
- Thakur, A., Pahwa, R., Singh, S., Gupta, R., 2010. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Enzyme Res.* 2010, 1–7. doi:10.4061/2010/170549
- Yamanaka, H.T., 2005. *Sucos Cítricos*. CETESB, São Paulo.

Considerações finais e perspectivas

Neste trabalho, o potencial de *C. byssicola* em produzir enzimas holocelulolíticas quando cultivado em fontes de carbono lignocelulósicas foi demonstrado. Os registros na literatura relacionados à produção de holocelulases por espécies do gênero *Clonostachys* são escassos, embora estas espécies sejam intensamente estudadas em processos de controle biológico.

As enzimas produzidas por *C. byssicola* aparentemente se organizam em complexos multienzimáticos, e esta organização supramolecular pode favorecer a hidrólise eficiente da lignocelulose. É necessária a purificação destes complexos para a melhor compreensão dos mecanismos que governam as interações entre as proteínas, bem como para a avaliação da performance desses complexos durante a sacarificação de biomassa lignocelulósica.

Além da caracterização dos complexos, o secretoma total do fungo também foi analisado por LC-MS/MS. Foram identificadas várias enzimas relacionadas à degradação de lignocelulose, quitina e amido, além de proteases. A avaliação do potencial dos secretomas em sacarificar sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado, e os secretomas apresentaram capacidade de remoção eficiente da xilana, sendo observado que os secretomas atuam melhor sobre sabugo de milho em relação ao bagaço de cana. Como perspectivas futuras, pretende-se purificar e caracterizar algumas das holocelulases identificadas, como as xilanases, bem como traçar estratégias que possibilitem melhorar a performance dos secretomas em processos de sacarificação de biomassa.

O isolado de *C. byssicola* utilizado neste trabalho também se mostrou fonte de enzimas pectinolíticas. O fungo, quando cultivado em casca de laranja, produziu pectinases e pectato liases. A caracterização do secretoma produzido em resposta à casca de laranja revelou um conjunto diverso de enzimas relacionadas à degradação da pectina, incluindo enzimas que atuam na cadeia principal, como poligalacturonases, bem como enzimas responsáveis pela remoção de substituintes laterais, como esterases. Os estudos prosseguirão, no sentido de purificar e caracterizar algumas dessas pectinases, bem como avaliar

o potencial de aplicação industrial das enzimas, principalmente após a expressão em *Pichia pastoris*.

Anexo A

Tabelas referentes ao capítulo 3.

Tabela A1. Agrupamento das proteínas em função do secretoma. As proteínas foram agrupadas a partir do respectivo número de acesso, através de uma ferramenta online (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Grupo	Acesso	Classificação	Descrição
1:AV/CMC/X/ SB/SJ/EN/BG Total: 23	BN869_T00002256_1	GH 10	"Similar to xInC Endo-1 4-beta-xylanase C (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
	BN869_T00008324_1	CE 1	"Protein of unknown function"
	BN869_T00009242_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00000502_1	GH 10	"Similar to Endo-1 4-beta-xylanase A (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>)"
	BN869_T00002431_1	GH 2	"Similar to lacZ Beta-galactosidase (<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>)"
	BN869_T00012338_1	GH 11	"Similar to XYNA Endo-1 4-beta-xylanase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)"
	BN869_T00004760_1	GH 7	"Similar to EG-1 Endoglucanase EG-1 (<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>)"
	BN869_T00006247_1	Protease	"Similar to MCPB Carboxypeptidase 2 (<i>Trichophyton equinum</i>)"
	BN869_T00000463_1	Outra	"Similar to Guanyl-specific ribonuclease F1 (<i>Gibberella fujikuroi</i>)"
	BN869_T00003844_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00012416_1	GH 10	"Similar to xInA Endo-1 4-beta-xylanase (<i>Agaricus bisporus</i>)"
	BN869_T00009301_1	AA 7	"Protein of unknown function"
	BN869_T00002377_1	CE 15	"Protein of unknown function"
	BN869_T00006915_1	PL 1	"Similar to plyB Probable pectate lyase B (<i>Aspergillus oryzae</i>)"
	BN869_T00005458_1	GH 30	"Protein of unknown function"
	BN869_T00010662_1	GH 67/CBM 35	"Similar to Alpha-glucuronidase (<i>Hypocrea jecorina</i>)"
	BN869_T00006528_1	CE 5	"Similar to axe-2 Acetylxytan esterase 2 (<i>Penicillium purpurogenum</i>)"
	BN869_T00011374_1	Protease	"Similar to cpyA Carboxypeptidase Y homolog A (<i>Neurospora crassa</i>)"

	BN869_T00000315_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00010020_1	GH 5	"Similar to exgB Glucan endo-1 6-beta-glucosidase B (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00006577_1	GH 11	"Similar to XYL1 Endo-1 4-beta-xylanase I (<i>Cochliobolus carbonum</i>)"
	BN869_T00012991_1	GH 115	"Protein of unknown function"
	BN869_T00006107_1	GH 72	"Similar to gel2 1 3-beta-glucanosyltransferase gel2 (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
2:AV/CMC/SB/ SJ/EN/BG Total: 30	BN869_T00013142_1	AA 9	"Similar to eglD Probable endo-beta-1 4-glucanase D (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
	BN869_T00009450_1	GH 131	"Protein of unknown function"
	BN869_T00007808_1	AA 3	"Similar to MOX Alcohol oxidase (<i>Pichia angusta</i>)"
	BN869_T00007939_1	CE 12	"Similar to rha1 Rhamnogalacturonan acetylerase (<i>Aspergillus aculeatus</i>)"
	BN869_T00010665_1	GH26/CBM35	"Similar to manA Mannan endo-1 4-beta-mannosidase (<i>Rhodothermus marinus</i>)"
	BN869_T00002091_1	GH 5/CBM 1	"Similar to CMC3 Endoglucanase 3 (<i>Humicola insolens</i>)"
	BN869_T00007134_1	CE 12	"Similar to rha1 Rhamnogalacturonan acetylerase (<i>Aspergillus aculeatus</i>)"
	BN869_T00006837_1	GH 6	"Similar to cel6B Endoglucanase-6B (<i>Humicola insolens</i>)"
	BN869_T00010734_1	AA 9	"Similar to cel61a Endoglucanase-4 (<i>Hypocrea jecorina</i>)"
	BN869_T00012169_1	AA 9	"Similar to cel1 Cellulose-growth-specific protein (<i>Agaricus bisporus</i>)"
	BN869_T00010581_1	GH 7	"Similar to CBH-1 Exoglucanase 1 (<i>Cryphonectria parasitica</i>)"
	BN869_T00006338_1		
	BN869_T00002198_1	GH 53	"Similar to Arabinogalactan endo-1 4-beta-galactosidase (<i>Thielavia heterothallica</i>)"
	BN869_T00007911_1	AA 9	"Similar to cel61b Endoglucanase-7 (<i>Hypocrea jecorina</i> (strain QM6a))"
	BN869_T00007316_1	AA 9	"Similar to eglD Probable endo-beta-1 4-glucanase D (<i>Neosartorya fumigata</i>)"

	BN869_T00005784_1	GH 10	"Similar to xlnA Endo-1 4-beta-xylanase (<i>Agaricus bisporus</i>)"
	BN869_T00007663_1	GH5/CBM1/CBM46	"Similar to celB Endoglucanase B (<i>Paenibacillus lautus</i>)"
	BN869_T00006860_1	GH 5	"Similar to manC Probable mannan endo-1 4-beta-mannosidase C (<i>Aspergillus terreus</i>)"
	BN869_T00011633_1	CE 1/CBM 1	"Similar to axeA Probable acetylxyln esterase A (<i>Neosartorya fischeri</i>)"
	BN869_T00008392_1	PL 3	"Similar to plyF Probable pectate lyase F (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00012520_1	GH 7	"Similar to cbhA Probable 1 4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
	BN869_T00012943_1	GH 5/CBM 1	"Similar to manF Probable mannan endo-1 4-beta-mannosidase F (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00008174_1	AA 9	"Similar to eglD Probable endo-beta-1 4-glucanase D (<i>Aspergillus oryzae</i>)"
	BN869_T00008123_1	GH 45	"Similar to Putative endoglucanase type K (<i>Fusarium oxysporum</i>)"
	BN869_T00000971_1	CBM 1/CBM 61	"Protein of unknown function"
	BN869_T00008118_1	GH 5	"Similar to eglA Endo-beta-1 4-glucanase A (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00012438_1	AA 8	"Similar to CDH-1 Cellobiose dehydrogenase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)"
	BN869_T00008587_1	GH 30	"Similar to 6GAL Endo-beta-1 6-galactanase (<i>Trichoderma viride</i>)"
	BN869_T00007862_1	GH 7	"Similar to cbh1 Exoglucanase 1 (<i>Trichoderma harzianum</i>)"
	BN869_T00012938_1	GH 3	"Similar to bglL Probable beta-glucosidase L (<i>Aspergillus terreus</i>)"
3:AV/CMC/ X/SB/SJ/EN Total: 2	BN869_T00002752_1	Protease	"Similar to EDA2 Probable serine protease EDA2 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)"
	BN869_T00008942_1	CE 10	"Similar to LIP1 Lipase 1 (<i>Candida rugosa</i>)"
4:AV/CMC/X/	BN869_T00000618_1	GH 47	"Similar to mns1B Probable mannosyl-oligosaccharide alpha-1 2-mannosidase 1B (<i>Aspergillus clavatus</i>)"

SB/SJ/BG Total: 3	BN869_T00000063_1	GH 55	"Similar to EXG1 Glucan 1 3-beta-glucosidase (<i>Cochliobolus carbonum</i>)"
	BN869_T00011726_1	Protease	"Similar to SPM1 Subtilisin-like proteinase Spm1 (<i>Magnaporthe oryzae</i>)"
5:AV/CMC/X SB/EN/BG Total: 1	BN869_T00003973_1	Outra	"Protein of unknown function"
6:AV/CMC/X/ SJ/EN/BG Total: 1	BN869_T00000082_1	GH 17	"Similar to eglC Probable glucan endo-1 3-beta-glucosidase eglC (<i>Aspergillus terreus</i>)"
7:AV/X/SB/SJ EN/BG Total: 7	BN869_T00002655_1	GH 5	"Protein of unknown function"
	BN869_T00000456_1	CE 10	"Similar to Ces1c Carboxylesterase 1C (<i>Mus musculus</i>)"
	BN869_T00012451_1	GH 3	"Similar to xlnD Probable exo-1 4-beta-xylosidase xlnD (<i>Neosartorya fischeri</i>)"
	BN869_T00000037_1	GH 43	"Similar to xylB Xylosidase/arabinosidase (<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>)"
	BN869_T00006537_1	GH 10	"Similar to xlnA Endo-1 4-beta-xylanase (<i>Agaricus bisporus</i>)"
	BN869_T00013655_1	Protease	"Similar to MCYG_01475 Metalloprotease A-like protein MCYG_01475 (<i>Arthroderma otae</i>)"
	BN869_T00002568_1	CE 10	"Similar to xynB Endo-1 4-beta-xylanase B (<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>)"
8:AV/X/CMC/ SB/SJ	BN869_T00011828_1	GH 31	"Similar to agdC Probable alpha/beta-glucosidase agdC (<i>Neosartorya fischeri</i>)"

Total: 2	BN869_T00011409_1	GH 16	"Protein of unknown function"
9:AV/CMC/X/ EN/BG Total: 1	BN869_T00008490_1		"Similar to aprN Subtilisin NAT (<i>Bacillus subtilis</i> subsp. Natto)"
10:AV/CMC/ SB/SJ/EN Total: 2	BN869_T00008108_1	GH 6/CBM 1	"Similar to cbh2 Exoglucanase 2 (<i>Hypocrea jecorina</i>)"
	BN869_T00010170_1	AA 9	"Similar to eglD Probable endo-beta-1 4-glucanase D (<i>Neosartorya fischeri</i>)"
11:AV/CMC/ SB/SJ/BG Total: 2	BN869_T00004830_1	AA 9	"Similar to cel61a Endoglucanase-4 (<i>Hypocrea jecorina</i>)"
	BN869_T00009540_1	CE 5	"Similar to CUTA Cutinase (<i>Fusarium solani</i> subsp. <i>cucurbitae</i>)"
12:AV/CMC/ SB/EN/BG Total: 1	BN869_T00010915_1	PL 1	"Similar to pelA Probable pectin lyase A (<i>Aspergillus clavatus</i>)"
13:AV/X/SB/ SJ/EN Total: 4	BN869_T00009029_1	GH 2	"Similar to lacZ Beta-galactosidase (<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>)"
	BN869_T00011823_1	Protease	"Similar to SED3 Tripeptidyl-peptidase SED3 (<i>Arthroderma otae</i>)"
	BN869_T00007912_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00003895_1	AA 2	"Similar to katG2 Catalase-peroxidase 2 (<i>Magnaporthe oryzae</i>)"
14:AV/X/SB/	BN869_T00006165_1	Outra	"Protein of unknown function"

SJ/BG Total: 2	BN869_T00003888_1	CE 4	"Protein of unknown function"
15:AV/X/SB EN/BG Total: 1	BN869_T00008600_1	Outra	"Similar to PHO8 Repressible alkaline phosphatase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)"
16:AV/SB/SJ/ EN/BG Total: 14	BN869_T00005401_1	AA 9	"Similar to eglD Probable endo-beta-1 4-glucanase D (<i>Aspergillus oryzae</i>)"
	BN869_T00005742_1	GH 26/CBM 35	"Similar to manA Mannan endo-1 4-beta-mannosidase (<i>Rhodothermus marinus</i>)"
	BN869_T00012998_1	CE 12	"Protein of unknown function"
	BN869_T00003834_1	Outra	"Similar to CYB2 Cytochrome b2 mitochondrial (<i>Hansenula anomala</i>)"
	BN869_T00008619_1	Outra	"Similar to Galm Aldose 1-epimerase (<i>Mus musculus</i>)"
	BN869_T00002081_1	PL 1	"Similar to plyB Pectate lyase plyB (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00008148_1	CE 16	"Protein of unknown function"
	BN869_T00002940_1	GH 43	"Protein of unknown function"
	BN869_T00002494_1	PL 4	"Similar to rglA Rhamnogalacturonate lyase A (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00010670_1	GH 28	"Similar to pgaX Probable exopolygalacturonase X (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
	BN869_T00013292_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00000818_1	PL 9	"Similar to pelL Pectate lyase L (<i>Erwinia chrysanthemi</i>)"	
BN869_T00003371_1	AA 9	"Similar to cel1 Cellulose-growth-specific protein (<i>Agaricus bisporus</i>)"	

	BN869_T00003891_1	GH 28	"Similar to pgaX-2 Exopolygalacturonase X-2 (<i>Emericella nidulans</i>)"
17:AV/CMC/X/ SJ Total:1	BN869_T00011284_1	Outra	"Protein of unknown function"
18:AV/CMC/X/ BG Total:2	BN869_T00006603_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00005646_1	GH 72/CBM 43	"Similar to gel4 1 3-beta-glucanosyltransferase gel4 (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
19:AV/X/SB/ SJ Total: 3	BN869_T00006275_1	GH 31	"Similar to agdC Probable alpha/beta-glucosidase agdC (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
	BN869_T00002385_1	CE 1	"Protein of unknown function"
	BN869_T00001893_1	Outra	"Similar to GALM Aldose 1-epimerase (<i>Homo sapiens</i>)"
20:AV/X/SB/ EN Total: 1	BN869_T00006963_1	GH 3	"Similar to bglF Probable beta-glucosidase F (<i>Emericella nidulans</i>)"
21:AV/X/SJ/ EN Total: 2	BN869_T00004216_1	Outra	"Similar to oxdC Oxalate decarboxylase oxdC (<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168))"
	BN869_T00008432_1	Outra	"Similar to PADI3 Protein-arginine deiminase type-3 (<i>Ovis aries</i>)"
22:AV/SB/SJ/ EN Total: 16	BN869_T00009470_1	PL 4	"Similar to rglB Rhamnogalacturonate lyase B (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00010171_1	GH 43	"Similar to xynB Beta-xylosidase (<i>Bacillus pumilus</i>)"
	BN869_T00009330_1	CE 10	"Similar to AFUB_024920 Dipeptidyl-peptidase 5 (<i>Neosartorya fumigata</i>)"

	BN869_T00012951_1	CE 12	"Protein of unknown function"
	BN869_T00013332_1	PL 3	"Similar to plyF Probable pectate lyase F (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00012673_1	GH 105	"Similar to yteR Unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase YteR (<i>Bacillus subtilis</i>)"
	BN869_T00006503_1	Protease	"Similar to PR1 Cuticle-degrading protease (<i>Metarhizium anisopliae</i>)"
	BN869_T00009976_1	GH 12	"Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1 4-glucanase A (<i>Neosartorya fischeri</i>)"
	BN869_T00006995_1	AA 8	"Similar to CDH-1 Cellobiose dehydrogenase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)"
	BN869_T00012955_1	PL 3	"Similar to plyF Probable pectate lyase F (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00013531_1	Outra	"Similar to faeB-2 Probable feruloyl esterase B-2 (<i>Aspergillus oryzae</i>)"
	BN869_T00003913_1	CE 16	"Protein of unknown function"
	BN869_T00008893_1	GH 62	"Similar to axhA-2 Alpha-L-arabinofuranosidase axhA-2 (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00011863_1	Protease	"Similar to MEP Peptidyl-Lys metalloendopeptidase (<i>Pleurotus ostreatus</i>)"
	BN869_T00011200_1	Protease	"Similar to SED2 Tripeptidyl-peptidase SED2 (<i>Arthroderma otae</i>)"
	BN869_T00012233_1	GH 43/CBM 35	"Protein of unknown function"
23:AV/SB/SJ/ BG Total: 1	BN869_T00008762_1	CE 1	"Similar to fae-1 Feruloyl esterase B (<i>Neurospora crassa</i>)"
24:AV/SB/EN/ BG Total:2	BN869_T00000016_1	GH 28	"Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00003737_1	PL 3	"Similar to plyF Probable pectate lyase F (<i>Emericella nidulans</i>)"

25:AV/SJ/EN/ BG Total: 1	BN869_T00006851_1	CE 16	"Protein of unknown function"
26:AV/CMC/X Total: 8	BN869_T00011713_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00008857_1	GH 16	"Similar to crf1 Probable glycosidase crf1 (Neosartorya fumigata)"
	BN869_T00011744_1	Outra	"Similar to cspA Major cold shock protein CspA (Pseudomonas aeruginosa)"
	BN869_T00006277_1	Outra	"Similar to has-1 ATP-dependent RNA helicase has-1 (Neurospora crassa)"
	BN869_T00000240_1	Protease	"Similar to LAP2 Probable leucine aminopeptidase 2 (Trichophyton verrucosum)"
	BN869_T00010712_1	GH 15/CBM 20	"Similar to glaA Glucoamylase (Aspergillus oryzae)"
	BN869_T00006653_1	GH 3	"Similar to bglA Probable beta-glucosidase A (Aspergillus terreus)"
	BN869_T00006581_1	Protease	"Similar to MEP Peptidyl-Lys metalloendopeptidase (Pleurotus ostreatus)"
27:AV/CMC/ SB Total: 1	BN869_T00007609_1	AA 9	"Similar to eglD Probable endo-beta-1 4-glucanase D (Neosartorya fumigata)"
28:AV/CMC/SJ Total: 1	BN869_T00007629_1	Outra	"Similar to PHO2 Acid phosphatase (Yarrowia lipolytica)"
29:AV/CMC/ EN Total: 1	BN869_T00011048_1	Outra	"Protein of unknown function"
30:AV/X/SB	BN869_T00012029_1	GH 43	"Similar to xylB Xylosidase/arabinoxidase (Butyrivibrio fibrisolvens)"

Total: 3	BN869_T00001493_1	GH 95	"Similar to <i>afcA</i> Alpha-fucosidase A (<i>Emericella nidulans</i>)"
	BN869_T00007913_1	Outra	"Protein of unknown function"
31:AV/X/SJ Total: 1	BN869_T00005705_1	Outra	"Protein of unknown function"
32:AV/X/EN Total: 6	BN869_T00013102_1	Protease	"Similar to PEP2 Probable vacuolar protease A (<i>Arthroderma benhamiae</i>)"
	BN869_T00007794_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00008613_1	GH 18	"Similar to CTS1 Endochitinase 1 (<i>Coccidioides immitis</i>)"
	BN869_T00002717_1	Protease	"Similar to <i>lap2</i> Probable leucine aminopeptidase 2 (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
	BN869_T00010275_1	Outra	"Similar to <i>ubi-3</i> Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a (<i>Neurospora crassa</i>)"
	BN869_T00006211_1	Outra	"Similar to <i>gpd-1</i> Glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase (<i>Neurospora crassa</i>)"
33:AV/X/BG Total: 3	BN869_T00009809_1	Outra	"Similar to <i>act-1</i> Actin (<i>Neurospora crassa</i>)"
	BN869_T00009522_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00004020_1	GH 72	"Similar to <i>gel1</i> 1 3-beta-glucanosyltransferase <i>gel1</i> (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
34:AV/SB/SJ Total: 11	BN869_T00002519_1	GH 93	"Protein of unknown function"
	BN869_T00013610_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00006889_1	GH 43	"Protein of unknown function"
	BN869_T00008079_1	Protease	"Similar to <i>vpr</i> Minor extracellular protease <i>vpr</i> (<i>Bacillus subtilis</i>)"
	BN869_T00010709_1	Protease	"Similar to PR1 Cuticle-degrading protease (<i>Metarhizium anisopliae</i>)"
	BN869_T00010326_1	GH 2	"Similar to <i>lacZ</i> Beta-galactosidase (<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>)"

	BN869_T00011432_1	Protease	"Similar to MCFG_01475 Metalloprotease A-like protein MCFG_01475 (Arthroderma otae)"
	BN869_T00007922_1	Protease	"Similar to Trypsin (Fusarium oxysporum)"
	BN869_T00008046_1	Protease	"Similar to vpr Minor extracellular protease vpr (Bacillus subtilis)"
	BN869_T00005362_1	CE 4	"Protein of unknown function"
	BN869_T00004960_1	GH 33	"Protein of unknown function"
35:AV/EN/SB	BN869_T00010121_1	PL 3	"Similar to plyE Pectate lyase E (Emericella nidulans)"
Total: 2	BN869_T00012716_1	GH 3	"Similar to bglX Periplasmic beta-glucosidase (Salmonella typhimurium)"
36:AV/EN/SJ	BN869_T00007410_1	CE 16/CBM 1	"Protein of unknown function"
Total: 4	BN869_T00007329_1	CE 5	"Similar to CUTAB1 Cutinase (Alternaria brassicicola)"
	BN869_T00009073_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00000920_1	PL 1	"Similar to plyC Probable pectate lyase C (Aspergillus terreus)"
37:AV/SJ/BG	BN869_T00007127_1	CE 8	"Similar to pme1 Pectinesterase (Aspergillus tubingensis)"
Total: 1			
38:AV/BG/EN	BN869_T00009966_1	Protease	"Similar to GLRG_10315 Neutral protease 2 homolog MGG_10927 (Colletotrichum graminicola)"
Total: 1			
39:AV/CMC	BN869_T00005601_1	Outra	"Similar to sod-2 Superoxide dismutase [Mn] mitochondrial (Neurospora crassa)"
Total: 1			
40:AV/X	BN869_T00005074_1	Outra	"Similar to SOD1 Superoxide dismutase [Cu-Zn] (Cordyceps militaris)"
Total: 5	BN869_T00012671_1	GH 43	"Protein of unknown function"

	BN869_T00006689_1	Outra	"Similar to SNOG_13722 Protein SnodProt1 (Phaeosphaeria nodorum)"
	BN869_T00005914_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00005378_1	Outra	"Protein of unknown function"
41:AV/SB Total: 7	BN869_T00000338_1	GH 16	"Similar to SPBC21B10.07 Probable glycosidase C21B10.07 (Schizosaccharomyces pombe)"
	BN869_T00009363_1	AA 9	"Similar to cel61b Endoglucanase-7 (Hypocrea jecorina)"
	BN869_T00010084_1	GH 54/CBM 42	"Similar to abfB Probable alpha-N-arabinofuranosidase B (Aspergillus clavatus)"
	BN869_T00012733_1	GH 125	"Similar to mug157 Meiotically up-regulated gene 157 protein (Schizosaccharomyces pombe)"
	BN869_T00012526_1	GH 72/CBM 43	"Similar to aglD Probable alpha-galactosidase D (Neosartorya fumigata)"
	BN869_T00010745_1	GH 54/CBM 42	"Similar to abfB Probable alpha-N-arabinofuranosidase B (Aspergillus clavatus)"
	BN869_T00010928_1	GH 78/CBM 47	"Protein of unknown function"
42:AV/SJ Total: 3	BN869_T00011847_1	Protease	"Similar to lapA Leucine aminopeptidase A (Aspergillus oryzae)"
	BN869_T00009071_1	Protease	"Similar to PR1 Cuticle-degrading protease (Metarhizium anisopliae)"
	BN869_T00000761_1	GH 93	"Protein of unknown function"
43:AV/EN Total: 11	BN869_T00010759_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00005530_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00011408_1	PL 3	"Similar to pelA Pectate trisaccharide-lyase (Thermotoga sp.)"
	BN869_T00008859_1	PL 1	"Similar to plyB Probable pectate lyase B (Aspergillus oryzae)"

	BN869_T00003115_1	PL 4	"Similar to rglA Probable rhamnogalacturonate lyase A (<i>Neosartorya fischeri</i>)"
	BN869_T00007068_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00007123_1	GH 6	"Similar to cbh2 Exoglucanase 2 (<i>Hypocrea jecorina</i>)"
	BN869_T00009031_1	Protease	"Similar to PR1 Cuticle-degrading protease (<i>Metarhizium anisopliae</i>)"
	BN869_T00010913_1	PL 3	"Similar to plyF Probable pectate lyase F (<i>Aspergillus flavus</i>)"
	BN869_T00012872_1	Outra	"Similar to ndk1 Nucleoside diphosphate kinase (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
	BN869_T00008627_1	PL 1	"Similar to plyB Pectate lyase plyB (<i>Emericella nidulans</i>)"
44:AV/BG Total: 1	BN869_T00012549_1	Outra	"Protein of unknown function"
45:CMC/SJ Total: 1	BN869_T00009299_1	Outra	"Protein of unknown function"
47:X/EN Total: 1	BN869_T00010503_1	AA 7	"Similar to sol5 Bifunctional solanapyrone synthase (<i>Alternaria solani</i>)"
48:AV Total: 8	BN869_T00002992_1	Outra	"Similar to RPS15 40S ribosomal protein S15 (<i>Podospora anserina</i>)"
	BN869_T00005174_1	Outra	"Similar to sbp1 Ran-specific GTPase-activating protein 1 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)"
	BN869_T00006301_1	Outra	"Similar to YOL098C Uncharacterized protein YOL098C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)"
	BN869_T00009105_1	Outra	"Similar to MIMI_R196 Collagen-like protein 2 (<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>)"
	BN869_T00009303_1	AA 9	"Similar to cel61a Endoglucanase-4 (<i>Hypocrea jecorina</i>)"

	BN869_T00007653_1	PL 1	"Similar to plyB Probable pectate lyase B (<i>Aspergillus oryzae</i>)"
	BN869_T00010511_1	Protease	"Similar to cpdS Carboxypeptidase cpdS (<i>Aspergillus saitoi</i>)"
	BN869_T00007919_1	Protease	"Similar to vpr Minor extracellular protease vpr (<i>Bacillus subtilis</i>)"
49:SJ Total: 8	BN869_T00008504_1	Protease	"Similar to PR1 Cuticle-degrading protease (<i>Metarhizium anisopliae</i>)"
	BN869_T00010544_1	Protease	"Similar to Trypsin (<i>Fusarium oxysporum</i>)"
	BN869_T00006306_1	Outra	"Similar to abfA Probable alpha-N-arabinofuranosidase A (<i>Aspergillus flavus</i>)"
	BN869_T00000977_1	GH 16	"Protein of unknown function"
	BN869_T00004335_1	Protease	"Similar to PR1 Cuticle-degrading protease (<i>Metarhizium anisopliae</i>)"
	BN869_T00008308_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00002020_1	GH 28	"Similar to rgxB Alpha-L-rhamnosidase rgxB (<i>Aspergillus niger</i>)"
	BN869_T00007220_1	PL 3	"Similar to plyF Probable pectate lyase F (<i>Emericella nidulans</i>)"
50:X Total:96	BN869_T00008089_1	AA7	"Protein of unknown function"
	BN869_T00009495_1	AA9	"Protein of unknown function"
	BN869_T00009240_1	CBM48	"Protein of unknown function"
	BN869_T00013003_1	CE3	"Protein of unknown function"
	BN869_T00010941_1	CE4	"Protein of unknown function"
	BN869_T00013347_1	GH1	"Similar to BGL1B Beta-glucosidase 1B (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)"
	BN869_T00003280_1	GH16	"Protein of unknown function"
	BN869_T00010790_1	GH18	"Similar to CHI1 Chitinase 1 (<i>Aphanocladium album</i>)"

BN869_T00000718_1	GH20	"Similar to fdl Probable beta-hexosaminidase fdl (<i>Drosophila melanogaster</i>)"
BN869_T00004442_1	GH27	"Similar to agl1 Probable alpha-galactosidase B (<i>Penicillium simplicissimum</i>)"
BN869_T00009340_1	GH43	"Similar to xsa Xylosidase/arabinosidase (<i>Bacteroides ovatus</i>)"
BN869_T00008730_1	GH72/CBM43	"Similar to gel4 1_3-beta-glucanosyltransferase gel4 (<i>Neosartorya fumigata</i>)"
BN869_T00006249_1	GH75	"Protein of unknown function"
BN869_T00006596_1	Protease	"Similar to APE3 Aminopeptidase Y (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)"
BN869_T00003130_1	Protease	"Similar to eef1b Elongation factor 1-beta (<i>Xenopus laevis</i>)"
BN869_T00002693_1	Protease	"Similar to pep-4 Vacuolar protease A (<i>Neurospora crassa</i>)"
BN869_T00005659_1	Outra	"Similar to MOD-E Heat shock protein 90 homolog (<i>Podospora anserina</i>)"
BN869_T00004071_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00011709_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00006774_1	Outra	"Similar to grp78 78 kDa glucose-regulated protein homolog (<i>Neurospora crassa</i>)"
BN869_T00001867_1	Outra	"Similar to hsp70 Heat shock 70 kDa protein (<i>Neurospora crassa</i>)"
BN869_T00001146_1	Outra	"Similar to 14-3-3 protein homolog (<i>Trichoderma harzianum</i>)"
BN869_T00001502_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00001185_1	Outra	"Similar to SPAPYUK71.03c Uncharacterized protein PYUK71.03c (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)"
BN869_T00001686_1	Outra	"Similar to ANB1 Eukaryotic translation initiation factor 5A (<i>Candida albicans</i>)"
BN869_T00001914_1	Outra	"Similar to CLAH10 Aldehyde dehydrogenase (<i>Davidiella tassiana</i>)"
BN869_T00001760_1	Outra	"Protein of unknown function"

BN869_T00005269_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00001555_1	Outra	"Similar to 14-3-3 protein homolog (Trichoderma harzianum)"
BN869_T00003765_1	Outra	"Similar to pki1 Pyruvate kinase (Hypocrea jecorina)"
BN869_T00001776_1	Outra	"Similar to cot-3 Elongation factor 2 (Neurospora crassa)"
BN869_T00001294_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00011972_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00012556_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00003696_1	Outra	"Similar to TPM2 Tropomyosin-2 (Saccharomyces cerevisiae)"
BN869_T00001062_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00004209_1	Outra	"Similar to NCU00726 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase_ mitochondrial (Neurospora crassa)"
BN869_T00012665_1	Outra	"Similar to pgk1 Phosphoglycerate kinase (Trichoderma viride)"
BN869_T00011568_1	Outra	"Similar to enoA Enolase (Aspergillus oryzae)"
BN869_T00012731_1	Outra	"Similar to PAB1 Polyadenylate-binding protein_ cytoplasmic and nuclear (Chaetomium globosum)"
BN869_T00000171_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00004200_1	Outra	"Similar to sti1 Heat shock protein sti1 homolog (Schizosaccharomyces pombe
BN869_T00007263_1	Outra	"Similar to Pathogenesis-related protein 1A (Nicotiana tabacum)"
BN869_T00000420_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00001349_1	Outra	"Similar to rps-22 40S ribosomal protein S22 (Neurospora crassa)"

BN869_T00004523_1	Outra	"Similar to MDH1 Malate dehydrogenase_ cytoplasmic (Candida albicans)"
BN869_T00003001_1	Outra	"Similar to nhp-6 Non-histone chromosomal protein 6 (Neurospora crassa)"
BN869_T00005907_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00002863_1	Outra	"Similar to dld1 Dihydrolipoyl dehydrogenase_ mitochondrial (Schizosaccharomyces pombe)"
BN869_T00011974_1	Outra	"Similar to Ca-P60A Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type (Anopheles gambiae)"
BN869_T00005206_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00001214_1	Outra	"Similar to scon-3 E3 ubiquitin ligase complex SCF subunit scon-3 (Neurospora crassa)"
BN869_T00001222_1	Outra	"Similar to RPL2 60S ribosomal protein L2 (Ashbya gossypii)"
BN869_T00002616_1	Outra	"Similar to PLT5 Polyol transporter 5 (Arabidopsis thaliana)"
BN869_T00005887_1	Outra	"Similar to RPS11B 40S ribosomal protein S11-B (Saccharomyces cerevisiae)"
BN869_T00007763_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00005107_1	Outra	"Similar to TEF Elongation factor 1-alpha (Podospora anserina)"
BN869_T00002610_1	Outra	"Similar to phoA Acid phosphatase (Neosartorya fumigata)"
BN869_T00004573_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00013843_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00007586_1	Outra	"Similar to TEF3 Elongation factor 3 (Ashbya gossypii)"
BN869_T00011929_1	Outra	"Similar to dbnl-b Drebrin-like protein B (Xenopus laevis)"
BN869_T00006270_1	Outra	"Protein of unknown function"

BN869_T00003182_1	Outra	"Similar to FPR4 FK506-binding protein 4 (<i>Gibberella zeae</i>)"
BN869_T00001113_1	Outra	"Similar to SPBC1734.11 Mitochondrial protein import protein mas5 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)"
BN869_T00003829_1	Outra	"Similar to PRX1 Mitochondrial peroxiredoxin PRX1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)"
BN869_T00006673_1	Outra	"Similar to DOT5 Peroxiredoxin DOT5 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)"
BN869_T00006066_1	Outra	"Similar to ADP1 Probable ATP-dependent permease (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)"
BN869_T00003412_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00001246_1	Outra	"Similar to cdb4 Curved DNA-binding protein (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)"
BN869_T00001962_1	Outra	"Similar to pma-1 Plasma membrane ATPase (<i>Neurospora crassa</i>)"
BN869_T00001620_1	Outra	"Similar to GFA1 Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)"
BN869_T00004101_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00007634_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00001399_1	Outra	"Similar to TPK2 cAMP-dependent protein kinase type 2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)"
BN869_T00004761_1	Outra	"Similar to CAP22 Protein CAP22 (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)"
BN869_T00002911_1	Outra	"Protein of unknown function"
BN869_T00001560_1	Outra	"Similar to Protein disulfide-isomerase (<i>Humicola insolens</i>)"
BN869_T00009849_1	Outra	"Similar to rpl4b 60S ribosomal protein L4-B (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)"
BN869_T00001140_1	Outra	"Similar to tif-1 ATP-dependent RNA helicase eIF4A (<i>Neurospora crassa</i>)"
BN869_T00010796_1	Outra	"Protein of unknown function"

	BN869_T00011810_1	Outra	"Similar to MDH1 Malate dehydrogenase_ mitochondrial (Saccharomyces cerevisiae)"
	BN869_T00003377_1	Outra	"Similar to SPAC32A11.02c Uncharacterized protein C32A11.02c (Schizosaccharomyces pombe)"
	BN869_T00005975_1	Outra	"Similar to SSB1 Heat shock protein SSB1 (Candida albicans)"
	BN869_T00000088_1	Outra	"Similar to NPC2 Phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein (Magnaporthe oryzae)"
	BN869_T00001681_1	Outra	"Similar to hsp-88 Heat shock protein Hsp88 (Neurospora crassa)"
	BN869_T00001425_1	Outra	"Similar to cah Carbonic anhydrase (Erwinia carotovora)"
	BN869_T00000675_1	Outra	"Similar to erg10 Acetyl-CoA acetyltransferase (Schizosaccharomyces pombe)"
	BN869_T00003776_1	Outra	"Similar to AOC3 Membrane primary amine oxidase (Bos taurus)"
	BN869_T00004029_1	Outra	"Similar to ecm33 Protein ecm33 (Neosartorya fumigata)"
	BN869_T00011085_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00002977_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00006439_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00007584_1	Outra	"Protein of unknown function"
	BN869_T00004390_1	Outra	"Similar to cdc48 Cell division control protein 48 (Emericella nidulans)"
	BN869_T00009853_1	Outra	"Similar to TUF1 Elongation factor Tu_ mitochondrial (Saccharomyces cerevisiae)".
Total: 310			

Tabela A2. Descrição das famílias CAZy identificadas nos secretomas de *Clonostachys byssicola*. AA=Atividade auxiliar; CE=Esterase de carboidratos; GH= Glicosil-hidrolases; e PL= Polissacarídeo liases. Fonte: CAZy

Família	Atividades
AA 2	Manganês-peroxidase, peroxidase versátil, lignina peroxidase, peroxidase
AA 3	Celobiose-desidrogenase, glicose-1-oxidase, áril-álcool oxidase, álcool-oxidase, piranose-oxidase
AA 7	Glicooligossacarídeo-oxidase, quitooligossacarídeo-oxidase
AA 8	Domínio de redutase de ferro
AA 9	Monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) cobre-dependentes, anteriormente classificadas como hidrolases na família GH61
CBM 1	Módulos de aproximadamente 40 resíduos, encontrados quase que exclusivamente em fungos. A ligação à celulose é mediada por três resíduos de aminoácidos aromáticos, presentes em uma superfície plana.
CBM 48	Módulos de aproximadamente 100 resíduos, que apresentam função de ligação ao glicogênio, e estão normalmente associados à enzimas da família GH 13.
CBM 61	Módulos de aproximadamente 150 resíduos. Normalmente estão associados a domínios catalíticos de enzimas das famílias GH 16, GH 30, GH 31, GH 43, GH 53 e GH 66.
CE 1	Acetil-xilana esterase, cinamoil-esterase, feruloil-esterase, carboxilesterase, S-formilglutathione esterase, diacilglicerol-O-acil transferase, trealose-6-O-micoliltransferase
CE 3	Acetil-xilana esterase
CE 4	Acetil-xilana esterase, quitina-desacetilase, quitooligossacarídeo-desacetilase, peptidoglicano GlcNAc desacetilase, peptidoglicano ácido N-acetilmurâmico desacetilase
CE 5	Acetil-xilana esterase, cutinase
CE 8	Pectina-metilesterase
CE 10	Ariesterase, Carboxilesterase, acetilcolinesterase, colinesterase, esterol-esterase, Brefeldina-A esterase
CE 12	Pectina-acetilesterase, ramnogalacturonana-acetilesterase, Acetil-xilana esterase
CE 15	4-O-metilglicuronil metilesterase
CE 16	Acetilesterases ativas em vários acetilésteres de carboidratos
GH 1	β -glicosidase, β -galactosidase, β -manosidase, β -glicuronidase, β -xilosidase, β -D-fucosidase, florizina-hidrolase, exo- β -1,4 glicanase, 6-fosfo- β -galactosidase, 6-fosfo- β -glicosidase, estrictosidina- β -glicosidase, lactase, amigdalina- β -glicosidase, prunasina- β -glicosidase, vicianina-hidrolase, raucafricina-hidrolase, tioglicosidase, β -primeverosidase, isoflavonóide-7-O-apiosil- β -glicosidase, β -glicosidase ABA-específica, β -glicosidase DIMBOA, β -glicosidase, hidroxiiisourato-hidrolase
GH 2	β -galactosidase, β -manosidase, β -glicuronidase, α -L-arabinofuranosidase, manosilglicoproteína-endo- β -manosidase, exo- β -glicosaminidase
GH 3	β -glicosidase, xilana-1,4- β -xilosidase, β -glicosilceramidase, β -N-acetilhexosaminidase, α -L-arabinofuranosidase, glicano-1,3- β -glicosidase,

	glicano-1,4- β -glicosidase, oligoxiloglicano hidrolase produtora de isoprimeverose, coniferina- β -glicosidase, exo-1,3-1,4-glicanase, β -N-acetilglicosaminídeo-fosforilase
GH 5	Endo- β -1,4-glicanase/celulase, endo- β -1,4-xilanase, β -glicosidase, β -manosidase, β -glicosilceramidase, glican- β -1,3-glicosidase, liqueninase, exo- β -1,4-glicanase/celodextrinase, glican-endo-1,6- β -glicosidase, manan-endo- β -1,4-manosidase, celulose- β -1,4-celobiosidase, steril- β -glicosidase, endoglicoceramidase, quitosanase, β -primeverosidase, endo- β -1,4-glicanase xiloglicano-especifica, endo- β -1,6-galactanase, hesperidina-6-O- α -L-ramnosil- β -glicosidase, β -1,3-mananase, endo- β -1,4-xilanase arabinoxilana-específica, manana-transglicosilase.
GH 6	Endoglicanase, celobiohidrolase
GH 7	Endo- β -1,4-glicanase, Celobiohidrolase especifica para extremidades redutoras, quitosanase, endo- β -1,3-1,4-glicanase
GH 10	Endo- β -1,4 xilanase, Endo- β -1,3-xilanase, Tomatinase, Xilana-endotransglicosilase
GH 11	Endo- β -1,4 xilanase, Endo- β -1,3-xilanase.
GH 12	Endoglicanase, Xiloglicano-hidrolase, β -1,3-1,4-glicanase, xiloglicano-endotransglicosilase
GH 15	Glicoamilase, glicodextranase, α - α -trealase, dextran-dextrinase
GH 16	Xiloglicano-xiloglicosiltransferase, Queratan sulfato-endo-1,4- β -galactosidase, endo-1,3- β -glicanase, endo-1,3(4)- β -glicanase, liqueninase, β -agarase, k-carragenase, xiloglicanase, endo- β -1,3-galactanase, β -porfirinase, hialuronidase, endo- β -1,4-galactosidase, quitina- β -1,6-glicanosiltransferase, endo- β -q,4-galactosidase.
GH 17	Glicano-endo-1,3- β -glicosidase, glicano-1,3- β -glicosidase, liqueninase, β -glicosidase ABA-especifica, β -1,3-glicanosiltransglicosilase.
GH 18	Quitinase, lisozima, endo- β -N-acetilglicosaminidase, peptidoglicano hidrolase com, especificidade para endo- β -N-acetilglicosaminidase, hidrolase do fator Nod, inibidor de xilanase, concanavalina B, narbobina.
GH 20	β -hexosaminidase, lacto-N-biosidase, β -1,6-N-acetilglicosaminidase, β -6-SO ₃ -N-acetilglicosaminidase.
GH 26	β -mananase, exo- β -1,4-maniobiohidrolase, β -1,3-xilanase, liquenase/endo- β -1,3-1,4-glicanase, exo- β -mananase produtora de manobiose.
GH 27	α -galactosidase, α -N-acetilgalactosaminidase, isomalto-dextranase, β -L-arabinopiranosidase, galactana:galactana galactanosiltransferase.
GH 28	Poligalacturonase, α -L-ramnosidase, exopoligalacturonase, exopoligalacturonidase, ramnogalacturonase, ramnogalacturonana- α -1,2-galacturonohidrolase, endo-xilogalacturonana hidrolase.
GH 30	Endo- β -1,4-xilanase, β -glicosidase, β -glicuronidase, β -xilosidase, β -fucosidase, glicosilceramidase, β -1,6-glicanase, glicuronoarabinoxilana endo- β -1,4-xilanase, endo- β -1,6-galactanase, β -xilosidase especifica para a extremidade redutora.
GH 31	α -glicosidase, α -galactosidase, α -manosidase, α -1,3-glicosidase, sacarase-isomaltase, α -xilosidase, α -glicanoliase, isomaltosiltransferase, oligossacarídeo- α -1,4-glicosiltransferase, sulfoquinovosidase.

GH 33	Sialidase, neuraminidase, trans-sialidase, ácido 2-ceto-3-desoxinonônico hidrolase, anidrosialidase, ácido 3-desóxi-D-manoctulosônico hidrolase.
GH 43	β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, arabinanase, xilanase, galactana-1,3- β -galactosidase, α -1,2-L-arabinofuranosidase, exo- α -1,5-L-arabinofuranosidase, exo- α -1,5-L-arabinanase (mecanismo de inversão), β -1,3-xilosidase.
GH 45	Endoglicanase
GH 47	α -manosidase
GH 53	Endo- β -1,4-galactanase
GH 54	α -L-arabinofuranosidase, β -xilosidase
GH 55	Exo- β -1,3-glicanase, Endo- β -1,3-glicanase
GH 62	α -L-arabinofuranosidase
GH 67	α -glicuronidase, xilana- α -1,2-glicuronidase
GH 72	β -1,3-glicanosiltransglicosilase
GH 75	Quitosanase
GH 78	α -L-ramnosidase, ramnogalacturonana- α -L-ramnohidrolase
GH 93	Exo- α -L-1,5-arabinanase
GH 95	α -L-fucosidase, α -1,2-L-fucosidase, α -L-galactosidase
GH 105	Hidrolase de ramnogalacturonil insaturado, D-4,5-insaturado- β -glicuronil hidrolase
GH 115	Xilana- α -1,2-glicuronidase, α -(4-O-metil)-glicuronidase
GH 125	Exo- α -1,6-manosidase
GH 131	Exo- β -1,3/1,6-glicanase de especificidade relaxada, com atividade de endo- β -1,4-glicanase.
GH 132	Atividade sobre β -1,3-glicano.
PL 1	Pectato liase, Exo-pectato liase, Pectina-liase
PL 3	Pectato liase
PL 4	Ramnogalacturonana endoliase
PL 9	Pectato liase, Exopoligalacturonato liase, Tiopeptidoglicano liase

Anexo B

Tabelas referentes ao capítulo 4.

Tabela B.1. Proteínas identificadas no secretoma de *Clonostachys byssicola* obtido após cultivo em meio contendo casca de laranja como única fonte de carbono.

Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Mass	DBCAn	Description
2	1	BN869_T00010581_1	330.62	56	66	49	Y	48239	GH 7	Similar to CBH-1 Exoglucanase 1 (Cryphonectria parasitica)
1	2	BN869_T00000016_1	296.72	59	39	38	Y	37887	GH 28	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139))
3	3	BN869_T00012520_1	293.90	44	45	28	Y	46130	GH 7	Similar to cbhA Probable 1_4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A (Neosartorya fumigata (strain ATCC MYA-4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100))
8	14	BN869_T00006915_1	243.58	26	14	14	Y	35215	PL 1	Similar to plyB Probable pectate lyase B (Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40))
11	7	BN869_T00007939_1	224.10	40	11	11	Y	28724	CE 12	Similar to rha1 Rhamnogalacturonan

										acetylsterase (<i>Aspergillus aculeatus</i>)
5	4	BN869_T00012438_1	223.51	28	24	24	Y	86369	AA 8	Similar to CDH-1 Cellobiose dehydrogenase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)
4	6	BN869_T00010084_1	214.28	30	21	21	Y	51808	GH54/CBM42	Similar to abfB Probable alpha-N- arabinofuranosidase B (<i>Aspergillus clavatus</i> (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1))
6	5	BN869_T00011374_1	206.68	31	21	21	Y	52860	-	Similar to cpyA Carboxypeptidase Y homolog A (<i>Neurospora crassa</i> (strain ATCC 24698 / 74-OR23-1A / CBS 708.71 / DSM 1257 / FGSC 987))
7	10	BN869_T00007862_1	204.01	25	14	14	Y	54404	GH 7/CBM 1	Similar to cbh1 Exoglucanase 1 (<i>Trichoderma harzianum</i>)
9	8	BN869_T00008118_1	190.56	34	13	13	Y	36107	GH 5	Similar to eglA Endo- beta-1_4-glucanase A (<i>Emericella nidulans</i>)

											(strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139))
14	17	BN869_T00006689_1	183.77	60	12	12	Y	14444	-		Similar to SNOG_13722 Protein SnodProt1 (Phaeosphaeria nodorum (strain SN15 / ATCC MYA-4574 / FGSC 10173))
10	13	BN869_T00012416_1	182.48	17	12	11	Y	47376	GH 10		Similar to xlnA Endo-1_4-beta-xylanase (Agaricus bisporus)
16	12	BN869_T00010511_1	173.85	13	8	8	Y	60714	-		Similar to cpdS Carboxypeptidase cpdS (Aspergillus saitoi)
15	9	BN869_T00010712_1	170.36	18	8	8	Y	63041	GH15/CBM20		Similar to glaA Glucoamylase (Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40))
13	19	BN869_T00000463_1	169.92	62	11	11	Y	13323	-		Similar to Guanyl-specific ribonuclease F1 (Gibberella fujikuroi)
20	11	BN869_T00002610_1	163.38	21	8	8	N	47931	-		Similar to phoA Acid phosphatase (Neosartorya fumigata (strain ATCC MYA-

											4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100))
22	25	BN869_T00006819_1	157.03	36	6	6	Y	23454	-		Protein of unknown function
30	24	BN869_T00003913_1	143.78	16	7	7	Y	34216	CE 16		Protein of unknown function
26	15	BN869_T00005784_1	141.82	17	7	6	Y	36587	GH 10		Similar to xlnA Endo-1_4-beta-xylanase (Agaricus bisporus)
25	21	BN869_T00003737_1	141.53	32	6	6	Y	24203	PL 3		Similar to plyF Probable pectate lyase F (Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139))
19	34	BN869_T00003541_1	140.25	35	6	6	Y	15411	-		Protein of unknown function
17	55	BN869_T00013091_1	139.83	0	4	3	Y	2421531	-		Similar to tycC Tyrocidine synthase 3 (Brevibacillus parabrevis)
18	16	BN869_T00010544_1	137.35	30	10	10	Y	26328	-		Similar to Trypsin (Fusarium oxysporum)
31	22	BN869_T00007127_1	135.72	14	4	4	Y	34775	CE 8		Similar to pme1 Pectinesterase

										(Aspergillus tubingensis)
33	20	BN869_T00010745_1	132.24	17	7	7	Y	52388	GH54/CBM42	Similar to abfB Probable alpha-N-arabinofuranosidase B (Aspergillus clavatus (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1))
24	30	BN869_T00012141_1	128.43	13	4	4	Y	28700	-	Similar to Aspergillopepsin-2 (Aspergillus niger)
32	18	BN869_T00000315_1	125.93	20	6	6	Y	40064	-	Protein of unknown function
23	72	BN869_T00007957_1	124.39	0	3	2	Y	1440868	-	Similar to tycC Tyrocidine synthase 3 (Brevibacillus parabrevis)
28	31	BN869_T00010561_1	121.98	10	3	3	Y	25565	GH 12	Similar to Endoglucanase-1 (Aspergillus aculeatus)
39	46	BN869_T00006918_1	121.04	29	4	4	Y	9748	-	Protein of unknown function
37	26	BN869_T00009976_1	115.91	17	5	5	Y	26862	GH 12	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1_4-glucanase A (Neosartorya fischeri)

											(strain ATCC 1020 / DSM 3700 / FGSC A1164 / NRRL 181))
27	40	BN869_T00009299_1	106.27	16	3	3	Y	16030	-		Protein of unknown function
47	45	BN869_T00009450_1	105.66	8	2	2	Y	26962	GH 131		Protein of unknown function
29	23	BN869_T00002091_1	105.11	9	4	4	N	42229	GH5/CBM1		Similar to CMC3 Endoglucanase 3 (Hemicola insolens)
34	27	BN869_T00012943_1	100.55	11	3	3	Y	46404	GH5/CBM1		Similar to manF Probable mannan endo-1_4-beta-mannosidase F (Emericella nidulans (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139))
40	44	BN869_T00000958_1	90.94	7	3	3	Y	36548	GH18		Similar to chiD Chitinase D (Bacillus circulans)
41	39	BN869_T00002655_1	90.86	1	2	2	N	105108	GH5		Protein of unknown function
43	32	BN869_T00008108_1	85.50	9	2	2	Y	49685	GH6/CBM1		Similar to cbh2 Exoglucanase 2 (Hypocrea jecorina)

45	36	BN869_T00007913_1	81.63	20	3	3	Y	23547	-	Protein of unknown function
42	38	BN869_T00008124_1	79.82	8	3	2	Y	37007	GH 28	Similar to PG1 Endopolygalacturonase 1 (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)
46	33	BN869_T00006528_1	79.72	13	2	2	Y	22861	CE 5	Similar to axe-2 Acetylxyylan esterase 2 (<i>Penicillium purpurogenum</i>)
35	79	BN869_T00002081_1	71.03	9	2	2	Y	33773	PL 1	Similar to plyB Pectate lyase plyB (<i>Emericella nidulans</i> (strain FGSC A4 / ATCC 38163 / CBS 112.46 / NRRL 194 / M139))
48	48	BN869_T00011200_1	70.36	2	2	2	N	67620	-	Similar to SED2 Tripeptidyl-peptidase SED2 (<i>Arthroderma otae</i> (strain ATCC MYA-4605 / CBS 113480))
51	43	BN869_T00002198_1	69.10	5	2	2	N	37848	GH 53	Similar to Arabinogalactan endo-1_4-beta-galactosidase (<i>Thielavia heterothallica</i>)
38	28	BN869_T00000971_1	65.40	16	3	3	Y	32905	CBM1/CBM61	Protein of unknown function

Tabela B.2. Peptídeos identificados a partir da banda de SDS-PAGE mais abundante presente na fração SPG, eluída durante o gradiente em SPFF.

Protein Group	Protein ID	Protein Accession	Protein Name	Peptide	Unique	-10lgP	Mass	PTM
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.TVAGTTGSVTGVTYSGLTLK.N	Y	67.90	19.120.153	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.GLTIANMIIDNAAGDSGGGK.N	Y	64.49	18.739.203	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	R.TNNVVSNTFKDSTVQNSVQAIR.V	Y	63.14	25.202.932	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.YGVLIEQNYN(+.98)GGDLK.G	Y	62.57	16.828.151	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	R.VKTVAGTTGSVTGVTYSGLTLK.N	Y	62.36	21.391.787	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.NTDAFDIGDSTGVTITGAQVH.N	Y	61.31	21.179.866	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.SGSNIIFSGGLC(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.T	Y	60.72	24.321.865	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.YGVLIEQNYNGGDLK.G	Y	60.31	16.818.311	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	R.TNNVVSNTFK.D	Y	60.15	12.216.354	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.SITVEGASGAVLNPDGAR.W	Y	59.08	17.128.693	N

1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	S.GSNIIFSGGLC(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.T	Y	57.74	23.451.545	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	T.GSVTGVTYSGTLTK.N	Y	57.72	13.817.452	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	R.TN(+.98)NVVSNVTFK.D	Y	57.29	12.226.194	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.GVNGLTIANM(+15.99)IIDNAAGDSGGGK.N	Y	56.97	21.600.481	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	L.C(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.T	N	56.22	13.996.626	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.GLTIANM(+15.99)IIDNAAGDSGGGK.N	Y	55.70	18.899.153	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.VTFKDSTVQNSVQAIR.V	Y	55.02	17.919.479	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.DSTVQ(+.98)NSVQAIR.V	Y	54.96	13.176.525	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.NITKYGVLIQNYNGGDLK.G	Y	54.91	21.381.008	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	C.SGWTSNVTGGTK.V	Y	54.00	15.917.994	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.VVSNVTFKDSTVQNSVQAIR.V	Y	53.99	21.911.597	N

1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.IIFSGGLC(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.T	Y	53.89	20.870.581	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	Q.GNSITVEGASGAVLNPDGAR.W	Y	52.84	18.839.337	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	S.VTGVTYSGTLTK.N	Y	51.76	12.376.918	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	G.GLC(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.T	Y	51.43	15.697.682	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	G.LC(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.T	Y	50.99	15.127.467	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	D.STVQNSVQAIR.V	Y	50.15	12.016.415	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.TVAGTTGSVTGVTYSGTLTKNITK.Y	Y	49.85	23.682.849	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	G.SVTGVTYSGTLTK.N	Y	49.83	13.247.239	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.NITKYGVLIQNYN(+.98)GGDLK.G	Y	49.40	21.390.847	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	S.GGHGLSIGSVGGR.T	N	49.29	11.526.000	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	F.SGGLC(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.T	Y	48.99	17.138.217	Y

1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	T.NNVVSNVTFKSTVQNSVQAIR.V	Y	48.92	24.192.456	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	C.SGGHGLSIGSVGGR.T	N	48.68	12.396.320	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.DSTVQNSVQAIRVK.T	Y	47.64	15.438.318	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	S.ITVEGASGAVLNPDGAR.W	Y	47.05	16.258.373	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.YGVLIEQNYN(+.98)GGDLKGD.P	Y	43.18	18.548.635	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	T.GVTYSGLTLK.N	Y	41.19	10.375.757	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	G.TTGSVTGVTYSGLTLK.N	Y	40.76	15.838.407	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	G.VTYSGLTLK.N	Y	39.41	9.805.542	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	T.TGSVTGVTYSGLTLK.N	Y	34.75	14.827.930	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.NVVSNVTFK.D	Y	33.86	10.065.447	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	V.AGTTGSVTGVTYSGLTLK.N	Y	32.74	17.118.992	N

1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	N.NVVSNTFKDSTVQNSVQAIR.V	Y	31.86	23.052.026	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.YGVLIEQNYN(+.98)GGDLKGDPTTGVPIGL.T	Y	31.66	27.913.916	Y
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.YGVLIEQNYNGGDLKGDPT.T	Y	31.08	20.519.800	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.YGVLIEQNYNGGDLKGD.P	Y	30.43	18.538.795	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.NITKYGVLIEQNYNGGDLKGD.P	Y	29.58	23.101.492	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.TVAGTTGSVTGVTVSGL.T	Y	28.74	15.697.886	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.GDPTTGVPIGL.T	Y	26.24	11.265.870	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.YGVLIEQNYN.G	Y	26.09	12.115.823	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	K.YGVLIEQNYNGGD.L	Y	25.99	14.406.521	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	G.GHLSIGSVGGR.T	N	24.05	10.955.785	N
1	3	BN869_T00000016_1	Similar to AN8327 Endopolygalacturonase AN8327 (Emericella nidulans)	R.TNNVSNVTFKDSTVQN.S	Y	23.09	18.659.119	N

2	2	BN869_T00009976_1	imilar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	4-glucanase A (Neosartorya fischeri	Y	70.58	26.852.922	Y
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	4-glucanase A (Neosartorya fischeri	Y	67.89	25.571.973	Y
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	R.GPNGDTTVYSFVAPSNIGNFSGDLKK.F	Y	64.69	26.843.081	N
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	E.TPLATPTILGTK.W	Y	63.51	12.117.125	N
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	Y.GGAGPISDTNETPLATPTILGTK.W	Y	59.19	22.101.431	N
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	Y.SFVAPSNIGNFSGDLK.K	Y	53.05	16.518.206	N
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	R.GPNGDTTVYSFVAPSNIGNFSGDLK.K	Y	51.41	25.562.131	N
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	Y.SFVAPSNIGNFSGDLKK.F	Y	45.11	17.799.155	N
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	K.LFRGPN(+.98)GDTTVYSFVAPSNIGNFSGDLKK.F	Y	44.63	31.015.457	Y
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	K.LFRGPNGDTTVYSFVAPSNIGNFSGDLK.K	Y	40.58	29.724.668	N
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	K.LFRGPN(+.98)GDTTVYSFVAPSNIGNFSGDLK.K	Y	37.83	29.734.507	Y
2	2	BN869_T00009976_1	Similar to xgeA Probable xyloglucan-specific endo-beta-1"	N.GDTTVYSFVAPSNIGNFSGDLKK.F	Y	29.47	24.161.909	N
4	17	BN869_T00008124_1	Similar to PG1 Endopolygalacturonase 1 (Colletotrichum lindemuthianum)	Q.C(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.S	N	56.22	13.996.626	Y
4	17	BN869_T00008124_1	Similar to PG1 Endopolygalacturonase 1 (Colletotrichum lindemuthianum)	S.GGHGLSIGSVGGR.S	N	49.29	11.526.000	N

4	17	BN869_T00008124_1	Similar to PG1 Endopolygalacturonase 1 (Colletotrichum lindemuthianum)	C.SGGHGLSIGSVGGR.S	N	48.68	12.396.320	N
4	17	BN869_T00008124_1	Similar to PG1 Endopolygalacturonase 1 (Colletotrichum lindemuthianum)	G.GQC(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.S	Y	33.57	15.847.427	Y
4	17	BN869_T00008124_1	Similar to PG1 Endopolygalacturonase 1 (Colletotrichum lindemuthianum)	T.GGQC(+57.02)SGGHGLSIGSVGGR.S	Y	32.10	16.417.642	Y
4	17	BN869_T00008124_1	Similar to PG1 Endopolygalacturonase 1 (Colletotrichum lindemuthianum)	G.GHGLSIGSVGGR.S	N	24.05	10.955.785	N
3	1	BN869_T00011200_1	Similar to SED2 Tripeptidyl- peptidase SED2 (Arthroderma otae)	D.PVTGLGTPNFPELVK.L	Y	57.16	15.678.610	N
3	1	BN869_T00011200_1	Similar to SED2 Tripeptidyl- peptidase SED2 (Arthroderma otae)	R.GTSLLFSSGDNGVGSFAPEEC(+57.02)ISNDGKNTTK.F	Y	50.72	31.884.568	Y
3	1	BN869_T00011200_1	Similar to SED2 Tripeptidyl- peptidase SED2 (Arthroderma otae)	R.SIPNVISTSYGDEQSVPR.S	Y	49.56	20.629.807	N
3	1	BN869_T00011200_1	Similar to SED2 Tripeptidyl- peptidase SED2 (Arthroderma otae)	R.GTSLLFSSGDN(+.98)GVGSFAPEEC(+57.02)ISNDGKNTTK.F	Y	37.47	31.894.407	Y
3	1	BN869_T00011200_1	Similar to SED2 Tripeptidyl- peptidase SED2 (Arthroderma otae)	K.EFSPEVVAWRPEFTD.S	Y	34.41	18.078.417	N
6	12	BN869_T00003844_1	Protein of unknown function	K.SVPDLTEFAK.T	Y	57.64	11.055.656	N
6	12	BN869_T00003844_1	Protein of unknown function	K.FFGHVEFV	Y	38.73	9.804.756	N
5	7	BN869_T00002020_1	Similar to rgxB Alpha-L- rhamnosidase rgxB (Aspergillus niger)	L.GYAANM(+15.99)AASNLQVEGLR.G	Y	55.61	17.798.573	Y
5	7	BN869_T00002020_1	Similar to rgxB Alpha-L- rhamnosidase rgxB (Aspergillus niger)	L.GYAANMAASNLQVEGLR.G	Y	41.76	17.638.624	N

5	7	BN869_T00002020_1	Similar to rgxB Alpha-L-rhamnosidase rgxB (<i>Aspergillus niger</i>)	R.DLVIDGLR.G	Y	36.59	8.995.076	N
7	6	BN869_T00006851_1	Protein of unknown function	Q.HVVFSGSFTDQSR.A	Y	66.19	16.407.583	N
10	5	BN869_T00010084_1	Similar to abfB Probable alpha-N-arabinofuranosidase B (<i>Aspergillus clavatus</i>)	R.ALYSSYTGALYQVK.R	Y	59.24	15.627.980	N
11	19	BN869_T00009809_1	Similar to act-1 Actin (<i>Neurospora crassa</i>)	R.VAPEEHPVLLTEAPINPK.S	Y	52.51	19.530.570	N
12	23	BN869_T00006860_1	Similar to manC Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase C (<i>Aspergillus terreus</i>)	K.EIDPNHLVTWGGEGDFNIESDDWAYNGK.N	Y	51.75	31.773.950	N
13	27	BN869_T00010915_1	Similar to pelA Probable pectin lyase A (<i>Aspergillus clavatus</i>)	K.GVTGGASGSTVPTTTAELVSYLGDSSAR.V	Y	39.40	27.413.354	N
14	29	BN869_T00006524_1	Protein of unknown function	E.GPLTPEEWANAK.E	Y	30.56	13.116.459	N
15	33	BN869_T00005330_1	Similar to YJR142W Uncharacterized protein YJR142W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	D.YLEIITR.L	Y	28.73	9.065.175	N
17	87	BN869_T00004899_1	Similar to SPBC725.05c Uncharacterized pyrophosphatase/phosphodiesterase C725.05c (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	P.GPPVASFVNK.D	Y	24.04	10.145.498	N
18	14	BN869_T00004382_1	Similar to NUP192 Nucleoporin NUP192 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	S.Q(+.98)GTIITAEELK.A	Y	21.64	12.026.394	Y

Aneco C

*The Role of Fungal
Transcriptome Analysis and Side-
Chain Hydrolyzing Enzymes in
Sugarcane Bagasse Breakdown.*

*Capítulo publicado no livro “Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane”.

Marcos S. Buckeridge
Amanda P. De Souza *Editors*

Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane

 Springer

Chapter 6

The Role of Fungal Transcriptome Analysis and Side-Chain Hydrolyzing Enzymes in Sugarcane Bagasse Breakdown

Leonora Rios de Souza Moreira, Camila Louly Corrêa,
Helder Andrey Rocha Gomes, Glaucia Emy Okida Midorikawa,
Robert Neil Gerard Miller, and Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Abstract Lignocellulose represents one of the main sources of renewable energy for biofuel production. Within this context, sugarcane bagasse, which is a discarded by-product of sugarcane processing, is a rich source of lignin, hemicellulose, and cellulose. Since sugarcane bagasse is a complex lignocellulosic structure, its complete enzymatic hydrolysis requires the action of an enzyme system of main- and side-chain enzymes. The xylan component in sugarcane bagasse is arabinosylated at positions C-2 and/or C-3 and esterified with ferulic acid at the C-5 position. Accessory enzymes such as α -arabinofuranosidase and feruloyl esterase are responsible for enhanced accessibility and enzymatic hydrolysis of xylan. Under industrial conditions, numerous filamentous fungi can secrete enzymes or enzyme complexes belonging to the glycosyl hydrolases, carbohydrate esterases, and polysaccharide lyases for the hydrolysis of cellulose, hemicellulose, and lignin. Next-generation sequencing approaches for whole-genome and transcriptome analyses enable the identification of novel genes and isoforms in fungi encoding hydrolytic enzymes, thus increasing our understanding of mechanisms involved in gene expression induction in the presence of plant cell wall or its metabolic products. The downstream application will accelerate strain improvement for increased enzymatic efficiencies and hydrolytic enzyme cocktail development, contributing to reducing cellulosic bioethanol production costs.

Keywords Arabinofuranosidase • Feruloyl-esterase • Side-chain enzymes • Transcriptome • Sugarcane bagasse

†These authors contributed equally to this work.

L.R. de Souza Moreira • C.L. Corrêa • H.A.R. Gomes
G.E.O. Midorikawa • R.N.G. Miller • E.X.F. Filho (✉)
Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF CEP 70910-900, Brazil
e-mail: eximenes@unb.br

© Springer International Publishing AG 2017
M.S. Buckeridge, A.P. De Souza (eds.), *Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane*, DOI 10.1007/978-3-319-49826-3_6

81

Aneco D

*Enzymes and Food Industry: A
Consolidated Marriage*

***Capítulo aceito para publicação no livro “Advances in Biotechnology for Food Industry**

Enzymes and food industry: a consolidated marriage

Gomes, HAR, Moreira, LRS, Filho, EXF*

Enzymology Laboratory, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil. +556131072976.

*Corresponding author: eximenes.1@gmail.com

The development of food processing techniques is intertwined with the history of mankind. Some processes, such as brewing, are dated from the dawn of civilization. In this context, the use of biological agents has been of utmost importance for both the improvement of nutritional and sensorial characteristics of foods or development of new products. In the last century, the development of enzyme-based technologies greatly impacted food industry, since these biomolecules catalyze biochemical reactions with high specificity and mild physico-chemical conditions. Moreover, they are a safe tool for use in food processing. Enzymatic modification of foods was crucial for the development and expansion of some segments of food industry. The main classes of enzymes of considerable importance for the food industry include carbohydrate-acting enzymes, lipases and proteases, which are used in food processing, such as baking, cereal processing, juice production, meat processing and dairy production. This chapter aims at providing an overview of enzymatic applications in food industry as well as the newly progresses in this area.