

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 01/07/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Josiane Aniele Scarpassa

**Investigação de estratégias biotecnológicas no melhoramento do arsenal
enzimático termoestável de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756**

São José do Rio Preto

2019

Josiane Aniele Scarpassa

Investigação de estratégias biotecnológicas no melhoramento do arsenal enzimático termoestável de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 429829/2016-7
CAPES

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ruller
Coorientadora: Dra. Leticia Maria Zanthorlin Murakami

São José do Rio Preto

2019

S286i

Scarpassa, Josiane Aniele

Investigação de estratégias biotecnológicas no melhoramento do arsenal enzimático termoestável de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 / Josiane Aniele Scarpassa. -- São José do Rio Preto, 2019

198 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Roberto Ruller

Coorientadora: Leticia Maria Zanphorlin Murakami

1. Microbiologia. 2. Fungos termofílicos. 3. Coquetéis enzimáticos. 4. Sacarificação. 5. Bagaço de cana-de-açúcar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências
Ciências Letras e Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Josiane Aniele Scarpassa

Investigação de estratégias biotecnológicas no melhoramento do arsenal enzimático termoestável de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq
CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto Ruller
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Hamilton Cabral
USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Ricardo Rodrigues de Melo
LNBR – Laboratório Nacional de Biorrenováveis

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. João Claudio Thomeo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

1 de Julho de 2019

Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.
A Ele seja a glória para sempre! Amém.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir esta jornada, trilhando e iluminando meu caminho.

Aos meus pais Orlando Cesar Scarpassa, Célia Regina Crepaldi Scarpassa e toda minha família por todos momentos de apoio, motivações, incentivos, principalmente de entendimento dos momentos de falta, afastamento e reclusão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Ruller primeiramente por aceitar ser meu orientador proporcionando a oportunidade de realizar esta pesquisa, por todos os ensinamentos, por toda ajuda, por toda paciência, por todas lições de vida, por acreditar e confiar em mim.

A Dra. Leticia Maria Zanthorlin Murakami pela coorientação, oportunidade de aprendizado, pelos ensinamentos, paciência, incentivo, por toda a colaboração, e ajuda nos experimentos de biofísica.

Aos Professores. Dra. Eleni Gomes e Dr. Roberto da Silva, por toda confiança, aprendizado, experiência, conhecimento, colaboração e convivência prazerosa que proporcionaram ao me acolherem no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Unesp de São José do Rio Preto.

A Dra. Isabel Zaparoli Rosa, pelas cepas de fungos termofílicos, ensinamentos e amizade. A todos amigos que fiz e pessoas que convivi no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, do IBILCE/Unesp pelos ensinamentos, pela partilha de experiências de vida, e amizade.

Ao Laboratório e a todos Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPq), atual LNBR (Laboratório Nacional de Biorrenováveis) por todos os ensinamentos, confiança, infraestrutura, instalações, acolhimento, experiências de vida, convivências únicas. Agradeço em especial a Amanda Silva de Sousa, Ricardo Rodrigues de Melo, Felipe Cardoso Ramos, Renan Yuji Miyamoto, Gustavo Borin, Máisa Apolinário, Claudia Maria de Souza, Thiago Augusto Gonçalves, Douglas Antonio Alvaredo Paixão, Rebeca Mariano, Fernanda Lopes de Figueiredo, Emerson Gomes pela imensa proatividade, ajuda e amizade em todos estes anos de convivência.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) pela oportunidade de utilizar o Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas. A Central Analítica e ao grupo de estudos de pré-tratamentos físico-químicos do CTBE atual LNBR.

A técnica e curadora Clarice Rossato da Micoteca do Instituto de Biociências InBio da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pelas imagens de microscopia óptica dos fungos

A todas as pessoas, amigos e familiares que estiveram ao meu lado em algum momento dessa jornada, me apoiando, me ajudando, me incentivando, me fazendo companhia, me ouvindo e muitas vezes acreditando mais em mim do que eu mesma.

Agradeço imensamente à banca examinadora por ter aceitado participar avaliação do trabalho com suas valorosas contribuições e perspectivas científicas.

Agradeço o apoio financeiro do CNPq Projeto Universal 429829/2016-7

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

RESUMO

Fungos são considerados fontes promissoras de coquetéis enzimáticos atuando eficientemente na desconstrução de biomassas lignocelulósicas e na geração de açúcares fermentescíveis que podem ser fermentados a vários bioprodutos diferentes como, bioetanol, ácidos orgânicos, biocombustíveis, entre outros. O objetivo principal deste trabalho foi abordar varias estratégias biotecnológicas afim de estudar, avaliar e propor melhorias na performance de coquetéis enzimáticos termófilos, visando o aumento da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Neste contexto, o trabalho foi sub-dividido em 4 partes principais. Na primeira parte, inicialmente foi avaliada a produção enzimática em fermentação submersa dos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 (TA) comparado a duas novas cepas fúngicas termofílicas identificadas como *Rasamsonia emersonii* COQ e *Rasamsonia composticola* FMG6. Estas cepas termofílicas foram individualmente cultivadas em uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo. O repertório completo de CAZymes secretadas por estas cepas foi analisado por metodologia de espectrometria de massas (LC/MS). Na segunda parte do trabalho, foram realizadas combinações variadas do coquetel enzimático de TA com os coquetéis enzimáticos por *R. emersonii* COQ, *R. composticola* FMG6 e coquetel comercial CELLIC® CTec2. As melhores combinações foram utilizadas para ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar BIN, pré-tratado com método alcalino (BD) e pré-tratado hidrotérmico sem separação de licor (*Slurry*), o que demonstrou um grande potencial das enzimas de TA em melhorar a liberação de glicose e xilose. Este estudo foi o primeiro a caracterizar, avaliar, e aplicar o coquetel da espécie termofílica *R. composticola*, que demonstrou ser uma fonte de enzimas eficientes para a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Após a análise do conteúdo genômico e proteico do potencial arsenal enzimático de TA, foram detectadas a ausência de enzimas importantes para a desconstrução eficiente de biomassa. Neste sentido, na tentativa de abordar estratégias biotecnológicas importantes de otimização do coquetel termofílico de TA, nas duas seções finais deste trabalho, foram realizadas a suplementação de forma “ex-situ” de enzimas recombinantes específicas nos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados. Nesta etapa foram escolhidas, a endoglucanase GH12 da linhagem 11AG8 de *Streptomyces* sp., a lacase (CotA) de *Bacillus subtilis* e diversas GH11 para a suplementação do coquetel enzimático de TA. A endoglucanase GH12 mostrou-se eficaz em aumentar a liberação de 5% de glicose utilizando BD. Enquanto a enzima Lacase CotA se destacou por aumentar da produção tanto de glicose como xilose na sacarificação dos dois tipos de bagaços avaliados (BD e *Slurry*). O maior aumento utilizando Lacase recombinante ocorreu no bagaço *Slurry*, com um acréscimo de 27% para glicose e 9,42% para xilose. Devido às características importantes como a superioridade de atividade hemicelulásica de TA pela presença em abundância de endoxilanase (GH10) e sua provável sinergia com GH11, ausente no genoma e secretoma desta espécie, o trabalho foi dividido em uma última parte que descreve a avaliação de diversas GH11 recombinantes destinadas a suplementação do arsenal enzimático de TA. Dentre as GH11 avaliadas destacou-se a mutante termoestável XAT^{M12} que provocou um aumento de 16,5% na liberação de xilose após a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar BD. Nosso trabalho pode ser considerado o pioneiro no melhoramento por suplementação do potencial coquetel de TA utilizando enzimas recombinantes. Assim, destaca-se que estes resultados obtidos possivelmente deverão nortear o desenvolvimento de um melhor *pipeline* de avaliação e melhoramento de coquetéis enzimáticos para a sacarificação de biomassas lignocelulósicas produzidos pelo fungo *T. aurantiacus* entre outros.

Palavras-chave: coquetel enzimático, *Rasamsonia emersonii*, *Rasamsonia composticola* *Thermoascus aurantiacus*, sacarificação, enzimas termofílicas, bioetanol

ABSTRACT

Fungi are considered promising sources of enzymatic cocktails that act efficiently in the deconstruction of lignocellulosic biomass and in the generation of fermentable sugars that can be fermented to several different bioproducts, such as bioethanol, isolates, biofuels, among others. This study aimed to investigate several biotechnological strategies to evaluate and propose improvements in the performance of thermophilic enzymatic cocktails, aiming to advance the saccharification process of the sugarcane bagasse. In this context, this study was divided into four main parts. In the first part, we initially investigated the enzymatic production in submerged fermentation of the fungi species *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 (TA) compared with two new thermophilic fungal strains, referred to the *Rasamsonia emersonii* COQ and *Rasamsonia composticola* FMG6. The strains were individually cultivated in a mixture of sugarcane bagasse, corn straw, and wheat bran. The complete CAZyme repertoire secreted by these strains was investigated through mass spectrometry (LC/MS). On the second part of this study, several combinations of the enzymatic TA cocktail with the cocktails produced by *R. emersonii* COQ, *R. composticola* FMG6 and the commercial cocktail CELLIC® CTec2. The best combinations were used for BIN sugarcane bagasse saccharification assays, pre-treated with alkaline method (BD) and hydrothermal pretreatment without liquor separation (Slurry), which demonstrated a great potential of TA enzymes in improving glucose and xylose release. This study was the first to characterize, evaluate, and apply the cocktail of the thermophilic species *R. composticola*, which demonstrated considerable potential as a source of new efficient enzymes used for saccharification of the sugarcane bagasse. After analyzing the genomic and protein content of the enzymatic arsenal potential of TA, the absence of important enzymes for the efficient deconstruction of biomass was detected. In this sense, by aiming to employ biotechnological approaches to optimize thermophilic cocktails, in the final sections of this study, we investigated the ex situ supplementation of specific recombinant enzymes. In this stage, the endoglucanase GH12 from *Streptomyces* sp. Strain 11AG8, the laccase (CotA) from *Bacillus subtilis* and several GH11 were chosen for supplementation of the TA enzyme cocktail. The endoglucanase GH12 efficiently improved the liberation of 5% of glucose using BD. On the other hand, the Laccase CotA enzyme improved glucose and xylose production in the saccharification of both investigated bagasse (BD and Slurry). The highest increase using the recombinant Laccase occurred in the Slurry bagasse, with an increase of 27% of glucose and 9,42% for xylose. Due to the important features such as the superiority of the hemicellulase activity of TA as a consequence of a single type of endoxylanase (GH10) and its presumable synergy with GH11, our final study evaluated several recombinant GH11 that were allocated to supplement the enzymatic arsenal of TA. Between the investigated GH11, the stable mutant XAT^{M12} stood out from our analyses because it provoked an increase of 16,5% in the xylose liberation after saccharification of the BD bagasse. Our work can be considered the pioneer in improving by supplementing the potential cocktail of TA using recombinant enzymes. In this manner, we highlight that our findings may direct the development of pipelines to evaluate and improve enzymatic cocktails for the saccharification of lignocellulosic biomass produced by the fungus *T. aurantiacus* and others.

Keywords: enzymatic cocktail, *Rasamsonia emersonii*, *Rasamsonia composticola* *Thermoascus aurantiacus*, saccharification, thermophilic enzymes, bioethanol

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1. Esquema ilustrativo das principais metodologias utilizadas no capítulo 1.....	23
Fluxograma 2. Esquema ilustrativo das principais metodologias utilizadas no capítulo 2.....	24
Fluxograma 3. Esquema ilustrativo das principais metodologias utilizadas no capítulo 3.....	24
Fluxograma 4. Esquema ilustrativo das principais metodologias utilizadas no capítulo 5.....	25
Figura 1 Estimativa da produtividade de Etanol no Brasil.....	30
Figura 2. Parede celular primária do tipo II encontradas em gramíneas, como a cana-de-açúcar.	35
Figura 3. Componentes da celulose e as enzimas envolvidas em sua desconstrução.	39
Figura 4. Componentes da glicoarabinoxilana (GAX) e as enzimas envolvidas na sua desconstrução.	40
Figura 5. Componentes da β -1,3-1,4 glucana(BG) e as enzimas envolvidas na desconstrução.	40
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico (A) e produto de amplificação do gene ITS (B) para os fungos termofílicos selecionados.	66
Figura 7. Árvore filogenética dos isolados construída a partir de sequências parciais do gene ITS de cepas fúngicas selecionadas.....	68
Figura 8. Fungos filamentosos termófilos selecionados em ágar PDA cultivados por 144 horas.	69
Figura 9. Lâminas analisadas dos fungos filamentosos cultivados em PDA, cultivados em 144 horas e coradas com Coomassie Blue.....	70
Figura 10. Perfil proteico em eletroforese de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756, <i>R.composticola</i> FMG6 e <i>R. emersonii</i> COQ, em bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e palha de milho (1:1:1)..	72
Figura 11. Distribuição pelo número total de proteínas identificadas no secretoma das espécies de <i>T. aurantiacus</i> (A), <i>R. composticola</i> (B) e <i>R. emersonii</i> (C).	73
Figura 12. Número de CAZymes identificadas no secretoma de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756, <i>R.</i> <i>composticola</i> FMG6 e <i>R. emersonii</i> COQ separadas por tipo de atividade na desconstrução de diferentes carboidratos.....	75

Figura 13. Diversidades de Cazymes identificadas no secretoma de <i>T aurantiacus</i> CBMAI 756.	77
Figura 14. Diversidades de CAZymes identificadas no secretoma de <i>R. emersonii</i> COQ.	79
Figura 15. Diversidades de CAZymes identificadas no secretoma de <i>R. composticola</i> FMG6. As proteínas foram classificadas de acordo com o banco de dados CAZy. A abundância de cada família foi realizada com a contagem espectral normalizada.	81
Figura 16. Diagrama de Venn para as CAZymes encontradas no secretoma dos fungos <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 (TA) <i>R. composticola</i> FMG6 (RC) e <i>R. emersonii</i> COQ (RE).	84
Figura 17. Liberação de ART (açúcares redutores totais) pela hidrólise de bagaço <i>in natura</i> (ESTÁGIO 1) de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756, <i>R. emersonii</i> COQ e <i>R. composticola</i> FMG6 e suas combinações.	102
Figura 18. Efeito do pH e da temperatura sobre a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> na liberação de ART (açúcares redutores totais).	105
Figura 19. Liberação de açúcares redutores totais (ART) após a sacarificação de bagaço <i>in natura</i> por 24 horas (ESTÁGIO 1) utilizando extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 (A), CELLIC® CTec2 (E) e suas combinações.	108
Figura 20. Efeitos dos extratos enzimáticos de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 (TA), <i>R. composticola</i> FMG6 (RC), CELLIC® CTec2 (CC2) e combinação de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 + <i>R. composticola</i> FMG6 (TA+RC) na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .	111
Figura 21. Efeitos dos extratos enzimáticos de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 (TA), combinação de CELLIC® CTec2 e <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 (TA+CC2) e CELLIC® CTec2 (CC2) na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .	112
Figura 22. Produção de glicose (A) e xilose (B) por tempo de sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado BD.	114
Figura 23. Produção de glicose (A) e xilose (B) por tempo de sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado <i>Slurry</i> .	115
Figura 24. Atividade enzimática avaliada em painel de substratos comerciais.	118
Figura 25. Atividade enzimática avaliada em painel de substratos comerciais e substratos cromogênico.	119
Figura 26. Espécies de fungos com genes preditos para CAZymes pertencentes da família 12.	127

Figura 27. Análise em gel SDS-PAGE do grau de pureza da GH12 ST ..	134
Figura 28. Análise em gel SDS-PAGE do grau de pureza da lacase CotA.....	134
Figura 29. Painel de substratos para avaliação da especificidade da endoglucanase GH12 recombinante de <i>Streptomyces</i> sp. 11AG8.....	135
Figura 30. Efeito do pH (A) e temperatura (B) na atividade enzimática de GH12 recombinante de <i>Streptomyces</i> sp. 11AG8.....	137
Figura 31. Perfis de dicroísmo circular (CD) da endoglucanase da família GH12. (A) Espectros de CD das enzimas a 20 °C em citrato de sódio 20 mM pH 4,8. (B) Desnaturação térmica da estrutura secundária em tampão citrato de sódio 20 mM pH 4,8,	138
Figura 32. Liberação de glicose, em bagaço BD (10% m/m), pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com GH12 de <i>Streptomyces</i> sp. 11AG8.....	140
Figura 33. Liberação de xilose (g/L), em bagaço BD (10% m/m), pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com GH12 de <i>Streptomyces</i> sp. 11AG8.....	140
Figura 34 Liberação de glicose (g/L), em bagaço <i>Slurry</i> (10% m/m), pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com GH12 de <i>Streptomyces</i> sp. 11AG8.....	141
Figura 35 . Liberação de glicose (g/L), em bagaço <i>Slurry</i> (10% m/m), pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> suplementado com GH12 de <i>Streptomyces</i> sp. 11AG8.....	142
Figura 36 Liberação de glicose (g/L), em bagaço BD (10% m/m), pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com lacase CotA.	143
Figura 37 Liberação de xilose (g/L), em bagaço SAQ (10% m/m) pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> suplementado com lacase CotA.....	144
Figura 38. Liberação de glicose (g/L), em bagaço <i>Slurry</i> (10% m/m) pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com lacase CotA.	145
Figura 39. Liberação de xilose (g/L), em bagaço <i>Slurry</i> (10% m/m) pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> suplementado com lacase CotA.....	145
Figura 40. Estrutura da endo-xilanases GH11 ambiental termoestável (XAT). As setas roxas indicam as posições das substituições presentes nas enzimas mutantes XAT mutantes (XAT ^{M7} e XAT ^{M12}).....	151

Figura 41. Esquema representando as enzimas derivadas da GH11 ambiental (XAT) As mutações da enzima XAT ^{M7} foi concebida por evolução dirigida por Dumon et al. (2008) e a XAT ^{M12} foi concebida pelo nosso grupo de pesquisa	152
Figura 42. Domínios conservados da endo-xilanase pertencente a família GH11 da cepa <i>Streptomyces</i> sp F1..	154
Figura 43. Análise em gel SDS-PAGE do grau de pureza das endo-xilanases (A) XAT, (B) XAT ^{M7} , (C) XAT ^{M12} , (D) XBS ^{M6} , (E) GH11 ST . e (F) XBS ^{M6K99E}	160
Figura 44. Avaliação do efeito do pH e temperatura na atividade da enzima recombinante GH11 ST	161
Figura 45. Avaliação do efeito do pH e temperatura das enzimas recombinantes XAT XAT ^{M7} e XAT ^{M12} . Ensaios de pH ótimo realizado a 50 °C (A) XAT, (B) XAT ^{M7} e (C) XAT ^{M12} . O efeito da temperatura em tampão fosfato de sódio 50 mM realizado a pH 6 (C) XAT, (D) XAT ^{M7} (E) de XAT ^{M12}	162
Figura 46. Curvas de cinética enzimática da enzima recombinante GH11 ST	163
Figura 47. Curvas de cinética enzimática das enzimas recombinantes XAT, XAT ^{M7} e XAT ^{M12}	164
Figura 48. Perfis de dicroísmo circular (CD). Espectros de CD da enzima GH11 ST . Ensaios realizados a 20 °C em citrato de sódio 20 mM pH 4,8.	165
Figura 49. Perfis de dicroísmo circular (CD). Espectros de CD das enzimas recombinantes XAT, XAT ^{M7} e XAT ^{M12}	166
Figura 50. Curva de desnaturação térmica da enzima recombinantes GH11 ST em citrato de sódio 20 mM pH 4,8.	167
Figura 51. Curva de desnaturação térmica das enzimas recombinantes XAT, XAT ^{M7} e XAT ^{M12} em citrato de sódio 20 mM pH 4,8. L.	168
Figura 52. Liberação de açúcares redutores totais (ART) pela sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar BD pelas endo-xilanases XAT, XAT ^{M7} , XAT ^{M12} , GH11 ST , XBS ^{M6} XBS ^{M6+K99E}	169
Figura 53. Liberação de glicose (g/L), em bagaço BD (10% m/m) pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com endoxilanase XAT ^{M12}	173
Figura 54. Liberação de xilose (g/L), em bagaço BD (10% m/m) pelo coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com endoxilanase XAT ^{M12}	173

Figura 55. Liberação de glicose (g/L), em bagaço *Slurry* (10% m/m) pelo coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com endoxilanase XAT^{M12} 174

Figura 56. Liberação de xilose (g/L), em bagaço *Slurry* (10% m/m) pelo coquetel de *T. aurantiacus* CMAI 756 suplementado com endoxilanase XAT^{M12}. 175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade enzimática U/mL de xilanase (xil), β -xilosidase (β -xi), endoglucanase (End) e β -glicosidase (β -gli) dos extratos produzido por FES. TA (<i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756), TR (<i>T. reesei</i> RUT C-30) e isolados por Rosa, (2014): ASII/FMG6/COQ/S2/FMG1/FMG3/S4/A1I/CO.....	62
Tabela 2. Atividade enzimática U/mL de xilanase (xil), β -xilosidase (β -xi), endoglucanase (End) e β -glicosidase (β -gli) dos extratos produzido por FSm. TA (<i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756), TR (<i>T. reesei</i> RUT C-30) e isolados por Rosa, (2014): ASII/FMG6/COQ/S2/FMG1/FMG3/S4/A1I/CO.....	63
Tabela 3. Enzimas secretadas por <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 em 240 horas, produzido por FSm em bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo (1;1;1). Proteínas utilizadas como referência pertencente a cepa <i>T. aurantiacus</i> v1.0, depositado no JGI.....	86
Tabela 4. Perfil do enzimas secretadas por <i>R. emersonii</i> COQ, produzido por FSm (240 horas) em bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo (1;1;1). Proteínas utilizadas como referência pertencente a cepa <i>R. emersonii</i> CBS 393.64, depositado no NCBI.....	88
Tabela 5. Enzimas secretadas por <i>R. composticola</i> FMG6 durante o cultivo submerso (240 horas) em bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo (1;1;1). Todas as cepas depositadas no NCBI foram utilizadas como bancode proteínas.....	91
Tabela 6. Quantificação de proteínas totais e FPU para os extratos de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756, <i>R. emersonii</i> COQ, <i>R. composticola</i> FMG6 e <i>T. reesei</i> RUR C30.....	101
Tabela 7. Comparação dos parâmetros cinéticos, temperatura desnaturação térmica (Tm), e ótimo de atuação de cada endo-xilanase avaliadas	171

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AA	Atividades Auxiliares
ABTS	Ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AFEX	Ammonia Fiber Explosion
ART	Açúcares redutores totais
BG	β -glucano
BG	Endoglucanase
BIN	Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
BD	Bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com pré-tratamento alcalino
C6	Açúcares de seis carbonos
C5	Açúcares de cinco carbonos
CAZy	Carbohydrate-Active enzymes
CBM	Carbohydrate-binding modules
CE	Carboidratos Esterases
CC2	CELLIC® CTec2
CBHI	Celobiohidrolases I
CD	Dicroísmo circular
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
dbCAM	Recurso da web para anotação automatizada de enzimas ativas de
carboidratos	
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
DO₆₀₀	Densidade Óptica em 600 nanômetros
EC	Kegg enzyme
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EGII	Endoglucanase
EG1	Etanol de primeira geração
EG2	Etanol de segunda geração
Finep	Financiadora de Estudos e Projetos
FPase	Filter paper activity
FPU	Filter-Paper Unit
FPLC	Sistema de Cromatografia Líquida de Proteína Rápida
FSm	Fermentação submersa
GAX	Glucoarabinosilana
Gene ID	Número de identificação do gene depositado no banco de dados
depositado	
GH	Hidrolases Glicosídicas
GH11ST	Endo-xilanase de <i>Streptomyces</i> sp F1
GH12ST	Endoglucanase de <i>Streptomyces</i> sp 11AG8
GM	Glicomananas
GT	Glicosil Transferases
HMMER	Servidor que realiza pesquisa interativa de sequências por similaridade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

ITS	Internal transcribed spacer
JGI	Banco de genoma de fungos
kDa	Kilodaltons
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de
massas sequencial	
LPMO	Monooxigenases líticas de polissacarídeos
MW	Peso molecular em kilodaltons
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Atividade enzimática não detectada
OIE	Otimização de Interações Eletrostáticas
PAL	Pectatoliase
PAISS	Plano governamental para apoiar a inovação nos setores
açúcar/energia/química	
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAD	Detecção amperométrica pulsada
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PE	Pectinesterase
PGAs	Ácido poligalacturônico
PG	Poligalacturonase
PL	Pectinase
PL	Polissacarídeo Liases
PMSF	Fluoreto de benzilsulfonil
pNPA	p-nitrofenil-β-L-arabinofuranosídeo
pNPX	p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo
pNPG	p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
pNPC	p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
pet28a(+)	Vetor de expressão
RCL	Extrato de <i>Rasamsonia composticola</i> FMG6 produzido em fermentação
submersa	
RC	<i>Rasamsonia composticola</i> FMG6
RE	<i>Rasamsonia emersonii</i> COQ
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
Slurry	Bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico sem a
separação do licor	
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
TA	<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756
Tm	Desnaturação térmica
XG	Xiloglucano
XBS^{M6}	Endo-xilanase de <i>Bacillus subtilis</i> com mutação seis mutações geradas
in vitro	
XBS^{M6K99E}	Endo-xilanase de <i>Bacillus subtilis</i> com mutação seis mutações geradas
in vitro mais a mutação K99E	
XAT	Xilanase ambiental termoestável selvagem
XAT^{M7}	Xilanase ambiental termoestável com sete mutações
XAT^{M12}	Xilanase ambiental termoestável com doze mutações

SUMÁRIO

SUMÁRIO	17
1. INTRODUÇÃO	21
2. ESTRUTURA DO TRABALHO	23
3. <i>CAPÍTULO 1</i> REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1. Etanol como biocombustível	27
3.2. Etanol de segunda geração.....	28
3.2.1. Perspectivas para o etanol de segunda geração	29
3.3. A biomassa vegetal e os principais resíduos lignocelulósicos.....	31
3.3.1. O bagaço de cana-de-açúcar como um potencial energético	32
3.4. Composição estrutural da biomassa vegetal	32
3.4.1 Celulose	33
3.4.2. Hemicelulose	33
3.4.3. Lignina	33
3.4.4. Pectina.....	34
3.4.5. Tipos de parede celular	34
3.5. O pré-tratamento da biomassa	36
3.6. Processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica e fermentação	37
3.6.1. Desconstrução dos polímeros da parede celular	37
3.6.2. Entraves encontrados no processo de sacarificação	42
3.7. A sacarificação da biomassa com coquetéis enzimáticos termofílicos	43
3.8. Fungos filamentosos termófilos	43
3.8.1. Adaptações à termofilia	44
3.8.2. Aplicações biotecnológicas de enzimas de fungos termofílicos.....	45
4. OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo geral.....	48
4.2. Objetivos específicos	48
4.2.1. Capítulo 1.....	48
4.2.2. Capítulo 2.....	48
4.2.3. Capítulo 3.....	48
4.2.4. Capítulo 4.....	48
4.2.5. Capítulo 5.....	49

5. CAPÍTULO 2	50
5.1. RESUMO.....	51
5.2. INTRODUÇÃO.....	52
5.3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
5.3.1. Micro-organismos avaliados.....	53
5.3.2. Pré-inóculos e inóculo para as fermentações em estado sólido e submersa	53
5.3.3. Meio de cultivo e fermentações em estado sólido (FES)	54
5.3.4. Meio de cultivo e fermentações submersa (FSm).....	54
5.3.5. Produção das enzimas por FES.....	54
5.3.6. Produção das enzimas por FSm	54
5.3.7. Atividades enzimáticas de endo-xilanase, CMCase, β -glicosidase e β - xilosidase	55
5.3.8. Identificação das cepas selecionadas	55
5.3.9. Análise do secretoma fúngico por espectrometria de massa	57
5.3.10. Digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas.....	58
5.3.11. Cromatografia líquida acoplada em linha à espectrometria de massa (LC- MS/MS)	59
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.4.1. Substrato indutor utilizado para fermentação	60
5.4.2. Atividade enzimáticas dos extratos enzimáticos produzido por FES e por FSm.....	60
5.4.3. Seleção das cepas potenciais para identificação molecular	65
5.4.4. Amplificação da sequência parcial do gene ITS-rDNA (ITS), sequenciamento e identificação dos isolados de fungos termofílicos selecionados.	66
5.4.5. Análise de secretomas por espectrometria de massas.....	71
5.4.6. Análise global do perfil das famílias de CAZymes expressas.....	76
5.4.7 Panorama geral das principais CAZymes comuns identificadas nos secretomas.....	81
5.5. CONCLUSÕES.....	85
5.6. ANEXOS.....	86
6. CAPÍTULO 3	93
6.1. RESUMO.....	94
6.2. INTRODUÇÃO.....	95

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS	96
6.3.1 Produção de extratos enzimáticos.....	96
6.3.2. Hidrólise enzimática (ESTÁGIO 1)	96
6.3.3. Otimização das condições de sacarificação dos extratos enzimáticos de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 e <i>R. composticola</i> FMG6.....	97
6.3.4. Sacarificação enzimática (ESTÁGIO 2).....	98
6.3.5. Composição do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado	98
6.3.6. Quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).	99
6.3.7. Caracterização enzimática dos extratos enzimáticos utilizados na hidrólise em ESTÁGIO 2.	99
6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
6.4.1. Produção de extratos enzimáticos para avaliação da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (<i>Screening</i> de combinações).....	101
6.4.2. Avaliação do potencial de sacarificação de hidrólise dos extratos enzimáticos de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756, <i>R. emersonii</i> COQ e <i>R. composticola</i> FMG6 produzidos por FSm.	102
6.4.3. Otimização das condições de sacarificação das melhores combinações dos extratos de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 e <i>R. composticola</i> FMG6.	105
6.4.4. Combinação dos extratos enzimáticos de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 com coquetel comercial CELLIC® CTec2	107
6.4.5. Sacarificação utilizando as melhores combinações avaliadas no ESTÁGIO 1	108
6.4.6. Quantificação de glicose e xilose proveniente da sacarificação de bagaço de cana-de- açúcar <i>in natura</i> ESTÁGIO 2 (50 mL).	109
6.4.7. Quantificação por HPLC da glicose e xilose provenientes da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....	113
6.4.8. Atividade dos coquetéis enzimáticos em painel de substratos utilizados na sacarificação	116
6.5. CONCLUSÕES.....	122
7. CAPÍTULO 4	123
7.1. RESUMO.....	124
7.2. INTRODUÇÃO.....	125

7.2.1 Endoglucanase da família 12 (GH12) como enzima potencial para a suplementação do extrato de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756	126
7.2.2. Lacase (CotA) como enzima potencial para a suplementação do extrato de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756	128
7.3 MATERIAIS E MÉTODOS	129
7.3.1 Produção do extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756	129
7.3.2 Produção das enzimas recombinantes	130
7.3.3 Purificação por cromatografia por afinidade (IMAC)	130
7.3.4 Atividade enzimática	131
7.3.5. Caracterização bioquímica, valores ótimos de pH e temperatura.....	131
7.3.6. Caracterização biofísica parcial	131
7.3.7. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados	132
7.3.8. Suplementação de coquetéis enzimáticos fúngicos por enzimas recombinantes microbianas para a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.	133
7.3.9. Quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	133
7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
7.4.1. Expressão e purificação da GH12 e lacase CotA	134
7.4.2. Caracterização bioquímica das enzimas recombinantes.....	135
7.4.3. Estudo do perfil da estrutura secundária por dicróismo circular (CD) de GH12.....	137
7.4.4. Suplementação do coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 com GH12 de <i>Streptomyces</i> sp. 11AG8 e lacase CotA recombinantes	139
7.4.5. Liberação de glicose e xilose na sacarificação dos bagaços BD com o coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756, suplementado com a endoglucanase pertencente à família GH12	139
7.4.6. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de “bagaço <i>slurry</i> ” com coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756, suplementado com a endoglucanase pertencente a família GH12	141
7.4.7. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados BD e <i>slurry</i> com coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com lacase CotA.....	143
7.4.8. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de “bagaço <i>slurry</i> ” com coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com lacase.....	144

7.5. CONCLUSÕES.....	146
8. CAPÍTULO 5	147
8.1. RESUMO	148
8.2 INTRODUÇÃO.....	149
8.2.1. Endo-xilanases ambientais termoeestáveis (XAT, XAT ^{M7} , XAT ^{M12}).....	150
8.2.2 Endo-xilanases mutante XBS ^{M6} e XBS ^{M6+K99E}	152
8.2.3 Endo-xilanases de <i>Streptomyces</i> sp F1	153
8.3 MATERIAIS E MÉTODOS	153
8.3.1 Produção do extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756	153
8.3.2 Endo-xilanases avaliadas	153
8.3.3.1 Amplificação do gene de endo-xilanase por PCR	154
8.3.3.2 Obtenção do vetor de expressão da endo-xilanase GH11 ST	155
8.3.4 Expressão e purificação das endo-xilanases recombinantes XAT, XAT ^{M7} , XAT ^{M12} XBS ^{M6} , XBS ^{M6K99E} e GH11 ST	156
8.3.5. Caracterização bioquímica.....	156
8.3.6. Caracterização biofísica parcial das enzimas recombinantes purificadas	157
8.3.7. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados utilizados na sacarificação	158
8.3.8. Suplementação de coquetéis enzimáticos fúngicos por enzimas recombinantes microbianas para a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.	158
8.3.9. Quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	159
8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	159
8.4.1 Expressão e purificação das XAT, XAT ^{M7} , XAT ^{M12} , GH11 ST XBSM6 e XBS ^{M6K99}	159
8.4.2. Avaliação das condições ótimas de pH e temperatura das enzimas XAT, XAT ^{M7} , XAT ^{M12} e GH11 ST	160
8.4.3. Determinação de parâmetros cinéticos	162
8.4.4. Análise do perfil da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)....	165
8.4.5. Desnaturação térmica das enzimas XAT, XAT ^{M7} , XAT ^{M12} e GH ST	166
8.4.6. Avaliação e comparação da eficiência das endo-xilanases XAT, XAT ^{M7} , XAT ^{M12} , GH11 ST , XBS ^{M6} e XBS ^{M6+K99E} na sacarificação do bagaço de cana-de- açúcar.....	169
8.4.7. Suplementação do coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 com endo- xilanase recombinante termoeestável XAT ^{M12}	171

8.4.8. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de bagaço BD com o coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com a endo-xilanase XAT ^{M12}	172
8.4.9. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de bagaço slurry com o coquetel de <i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756 suplementado com a endo-xilanase XAT ^{M12}	174
8.5. CONCLUSÕES.....	175
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	176
10. REFERÊNCIAS	177

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a busca por segurança energética e sustentabilidade inicialmente visou a obtenção do etanol de primeira (E1G) a partir do caldo da cana-de-açúcar (sacarose), pois contribui para a redução de emissões de gases promotores do efeito estufa. Acredita-se que, no futuro, o E1G e de segunda geração (E2G) proverão grande parte da matriz energética para meios de transporte. Para tanto, investimentos para o desenvolvimento de E2G têm sido realizados ao redor do mundo a fim de reduzir os custos e aumentar o rendimento da produção desse combustível por meio de desenvolvimento técnico (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; NIGAM; SINGH, 2011; VISSER et al., 2015).

Para a produção do E2G é preciso que os açúcares presentes na biomassa vegetal se tornem solúveis. Essa solubilidade ocorre a partir da sacarificação dos componentes lignocelulósicos. Para que esse processo ocorra de maneira efetiva, a biomassa deve ser pré-tratada com o objetivo de desorganizar a estrutura complexa da parede celular através do uso de agentes físicos, químicos ou biológicos. Posteriormente, é realizada a sacarificação, que pode ser enzimática, liberando assim monômeros de açúcares para a fermentação alcoólica (SUN; CHENG, 2002).

No entanto, o processo de sacarificação enzimática é apontado como uma das etapas da produção de E2G que apresenta grandes entraves para a viabilização do processo de obtenção de açúcares fermentescíveis da biomassa. Esses entraves são causados pelo elevado valor da produção das enzimas que, segundo estimativas, consistem em cerca de metade do custo do processo total para o E2G, além dos baixos rendimentos de conversão e tempos elevados para o processo ocorrer (BORTOLAZZO, 2011; EVELEIGH, 1987).

Tendo em vista os principais desafios da sacarificação enzimática, é necessário desenvolver alternativas para diminuir os custos de produção de enzimas, além de gerar enzimas com melhores rendimentos e eficiência. Uma alternativa para reduzir os custos de produção de enzimas durante cultivo de micro-organismos é a utilização de resíduos agrícolas, visto que o Brasil é um grande produtor desses materiais. Assim, o uso desta matéria-prima em processos biotecnológicos é interessante devido ao seu baixo custo e alta abundância. Outra medida para melhorar o rendimento e eficiência da etapa de sacarificação, é o uso de coquetéis enzimáticos termofílicos, no qual possuem enzimas ativas em temperaturas acima de 50 °C. A sacarificação a altas temperaturas é descrita como sendo vantajosa, por aumentar os rendimentos da sacarificação da biomassas ligno-hemicelulósicas. Além disso, os coquetéis termofílicos empregam menor carga enzimática, aumentam taxas de conversão

de açúcar resultando em tempos de incubação menores e diminuem os níveis de contaminação por micro-organismos (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008; MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; MCCLENDON et al., 2012). Assim, os coquetéis enzimáticos termofílicos produzidos por fungos podem aprimorar o processo de sacarificação, tornando-o mais rápido, eficiente e menos oneroso (BALA; SINGH, 2019; MCCLENDON et al., 2012).

Os fungos termofílicos podem fornecer promissores coquetéis enzimáticos atuantes em temperaturas elevadas para a sacarificação de materiais lignocelulósicos, tornando esta etapa mais eficiente na obtenção de açúcares fermentescíveis destinadas ao E2G. Nesse cenário, a diversidade microbiana ainda inexplorada na natureza é extremamente importante, visto que a prospecção de novas cepas ou espécies de fungos pode disponibilizar novos e eficientes arsenais enzimáticos termofílicos (BORTOLAZZO, 2011; DELABONA et al., 2012; HARGREAVES; JR, 2008; MORETTI et al., 2012).

Neste contexto, este trabalho buscou desenvolver novos coquetéis enzimáticos termofílicos a partir da seleção e investigação de cepas fúngicas produtoras de enzimas envolvidas na desconstrução da biomassa. Além disso, com enfoque no aumento do rendimento da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, extratos enzimáticos termofílicos foram combinados e coquetéis fúngicos foram suplementados com enzimas recombinantes complementares.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho avaliou duas estratégias biotecnológicas para o melhoramento do arsenal enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756. A primeira abordagem ocorreu com combinações de coquetéis enzimáticos provenientes de espécies diferentes e a segunda abordagem utilizou estratégias de suplementação com enzimas recombinantes ausentes no coquetel enzimático

Tanto a combinação de coquetéis enzimáticos como a suplementação enzimática *ex situ* proporcionaram aumento na liberação de glicose e xilose na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

Neste contexto, as enzimas recombinantes únicas, selecionadas estrategicamente neste trabalho (endoglucanase GH12, lacase e endo-xilanase GH11) conseguiram resultados tão bons e melhores que a combinação de coquetéis enzimáticos inteiros. Ainda, uma combinação otimizada das enzimas recombinantes utilizadas neste trabalho poderá ainda ser avaliadas na suplementação deste coquetel, melhorando ainda mais a eficiência na sacarificação de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

Enfim, em trabalhos futuros, quando técnicas efetivas de manipulação genética para a espécie *T. aurantiacus* estiverem melhor estabelecidas e padronizadas, nossos resultados poderão nortear propostas de inserção destes genes e de outros neste promissor fungo. O que possibilitará a obtenção de coquetéis enzimáticos termofílicos melhorados para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Esta estratégia ainda contribuiu significativamente no reaproveitamento do principal agroresíduo brasileiro, melhorando a produção de açúcares fermentescíveis desta recalcitrante biomassa. Esses açúcares poderão ser destinados tanto para a produção de bioetanol como outros bioprodutos com maior valor agregado.

10. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. W. W. ENZYMES MES AND PROTEINS FROIVI ORGANISMS THAT GROVY NEAR AND ABOVE 100°C. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 47, p. 627–58, 1993.
- ADAV, S. S.; CHAO, L. T.; SZE, S. K. Quantitative Secretomic Analysis of *Trichoderma reesei* Strains Reveals Enzymatic Composition for Lignocellulosic Biomass Degradation . **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 7, p. M111.012419, 2012.
- AIKAWA, J. T. YAMASHITA, M. NISHIYAMA, S. HORINOUCI, AND T. BEPPU. Effects of glycosylation on the secretion and enzyme activity of Mucor rennin, an aspartic proteinase of Mucor pusillus, produced by recombinant yeast. **Journal of Biological Chemistry**. v. 265: p. 13955–13959. 1990.
- ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and a - L - arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4552–4558, 2011.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- ANDER, P.; MARZULLO, L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2–3, p. 115–131, 1997.
- ARIAS, J M.; MODESTO, L. F. A.; POLIKARPOV, I.; PEREIRA, N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: **Optimization and synergism studies**, 2016.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719–739, 2005.
- BALA, A.; SINGH, B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. **Renewable Energy**, p. 1231–1244, 2019.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; WALTON, J. D. Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–15, 2010.
- BARNETT, C. B.; WILKINSON, K.; NAIDOO, K. J. Pyranose Ring Transition State Stability derived from Cellobiohydrolase I Induced Conformational and Electronic Strain. **American Chemical Society**. p. 13–16, 2010.
- BELEN, A.; MARIA, M.; MORETTI, D. S.; BEZERRA-BUSSOLI, C.; CARREIRA, C.; BLANDINO, A.; GOMES, E. Bioresource Technology Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 316–323, 2015.

BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 7–18, 2013.

BERKA, R. M.; GRIGORIEV, I. V.; OTILLAR, R.; SALAMOV, A.; GRIMWOOD, J.; REID, I.; ISHMAEL, N.; JOHN, T.; DARMOND, C.; MOISAN, M. C.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; LOMBARD, V.; NATVIG, D. O.; LINDQUIST, E.; SCHMUTZ, J.; LUCAS, S.; HARRIS, P.; POWLOWSKI, J.; BELLEMARE, A.; TAYLOR, D.; BUTLER, G.; DE VRIES, R. P.; ALLIJN, I. E.; VAN DEN BRINK, J.; USHINSKY, S.; STORMS, R.; POWELL, A. J.; PAULSEN, I. T.; ELBOURNE, L. D. H.; BAKER, S. E.; MAGNUSON, J.; LABOISSIERE, S.; CLUTTERBUCK, A. J.; MARTINEZ, D.; WOGULIS, M.; DE LEON, A. L.; REY, M. W.; TSANG, A. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922–929, 2011.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287–296, 2007.

BLANCHETTE, R. A.; KRUEGER, E. W.; HAIGHT, J. E.; AKHTAR, M.; AKIN, D. E. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2–3, p. 203–213, 1997.

BLANDINO, A.; IQBALSYAH, T.; PANDIELLA, S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 164–169, 2002.

BLOCHL, E., R. RACHEL, S. BURGGRAF, D. HAFENBRADL, H. W. JANNASCH, K. O. STETTER. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. **Extremophiles** 1:14–21. 1997.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). Enzimas em biotecnologia: produções, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: **Interciência Brasil**, 2008, p. 241–271.

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. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. **Plos One**, 2015.

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Microbiologia (Madrid)**, p. 77, 2011.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** v. 254, p. 248–254, 1976.

BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. da S.; LIMA, D. J. da S.; PAIXÃO, D. A. A.; PRADELLA, J. G. da C.; FARINAS, C. S. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 316–324, 2014.

BRENELLI, L.; SQUINA, F. M.; FELBY, C.; CANNELLA, D. Laccase-derived lignin compounds boost cellulose oxidative enzymes AA9. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 1754-6834, 2018.

BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. 134 f.. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), Lorena, 2010.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3–4, p. 120–130, 2008.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W. Xylooligosaccharides Production from Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse Using Xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied of Biochemistry and Biotechnology** p. 1195–1205, 2010.

BRIJWANI, K.; VADLANI, P. V. Cellulolytic Enzymes Production via Solid-State Fermentation: Effect of Pretreatment Methods on Physicochemical Characteristics of Substrate. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

BUCKERIDGE, M.S; SILVA, G.B.; CAVALARI, A. **A Parede celular**. Kerbauy, G.B. (ed.) Fisiologia Vegetal. Guanabara Koogan S.A . R.J.2008.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. de. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, p. 365-380. 2010.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. Da. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–1900, 2009.

CALZADO, F.; PRATES, E. T.; GONÇALVES, T. A.; RUBIO, M. V.; ZUBIETA, M. P.; SQUINA, F. M.; SKAF, M. S.; DAMÁSIO, A. R. L. Molecular basis of substrate recognition and specificity revealed in family 12 glycoside hydrolases. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 12, p. 2577–2586, 2016.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1; p. 181- 188, 2010.

CARPITA, N. C. Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 445–476, 1996.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. and JONES, R.L., eds). Rockville, MD: **American Society of Plant Physiologists**, p. 52–108. 2000.

CARVALHO, W.; CARRILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CASCIATORI, P. A. **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (Unesp), São José do Rio Preto, 2015.

CENTER FOR STRATEGIC STUDIES AND MANAGEMENT - CGEE. **Second-generation sugarcane bioenergy & biochemicals: Advanced low-carbon fuels for transport and industry**. Brasília, DF 124 p. 2017.

CHEN, W.; XIE, T.; SHAO, Y.; CHEN, F. Phylogenomic Relationships between Amylolytic Enzymes from 85 Strains of Fungi. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 18–20, 2012.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 121–145, 2011.

CLAUS, H. Laccases: Structure, reactions, distribution. **Micron**, v. 35, n. 1–2, p. 93–96, 2004.

COLLINS, C. M.; MURRAY, P. G.; DENMAN, S.; MORRISSEY, J. P.; BYRNES, L.; TEERI, T. T.; TUOHY, M. G. Molecular cloning and expression analysis of two distinct β -glucosidase genes, *bg1* and *aven1*, with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. **Mycological Research**, v. 111, n. 7, p. 840–849, 2007.

COONEY, D. G., EMERSON, R. **Thermophilic fungi**. An account of their biology, activities and classification. W. H. Freeman; Co., San Francisco, Calif. 1964.

CONAB, C. N. de A. A Geração Termoelétrica com a queima do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil - Análise do desempenho da safra 2009-2010. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. 1, p. 157, 2011.

CONAB, C. N. de A. Perfil do Setor do Açúcar e do Alcool no Brasil - Safra 2011/2012. **Diretoria de Política Agrícola e Informações Superintendência de Informações do Agronegócio**, v. 5, p. 88, 2013.

CONAB, C. N. de A. Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. 17, n. 3, p. 1–74, 2016.

DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; YONG, K. P.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 235–241, 2005.

DAMÁSIO, A. R. L.; RUBIO, M. V.; OLIVEIRA, L. C.; SEGATO, F.; DIAS, B. A.; CITADINI, A. P.; PAIXÃO, D. A.; SQUINA, F. M. Understanding the function of conserved variations in the catalytic loops of fungal glycoside hydrolase family 12. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 8, p. 1494–1505, 2014.

DAR, R. A.; PHUTELA, U. G. Optimisation of Thermostable Laccase Production by *Thermoascus aurantiacus* MTCC 375 Using Paddy Straw as Substrate and Digested Biogas Slurry (DBS) as Medium in Solid State Fermentation. **Journal of Biofuels and Bioenergy**, v. 1, n. 2, p. 192, 2015.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological sciences**, v. 5, n. 6, p. 578–95, 2009.

DE OLIVEIRA, T. B.; GOMES, E.; RODRIGUES, A. Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy. **Extremophiles**, v. 19, n. 1, p. 31–37, 2015.

DE SIQUEIRA, F. G.; DE SIQUEIRA, A. G.; DE SIQUEIRA, E. G.; CARVALHO, M. A.; PERETTI, B. M. P.; JARAMILLO, P. M. D.; TEIXEIRA, R. S. S.; DIAS, E. S.; FÉLIX, C. R.; FILHO, E. X. F. Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues. **Biodegradation**, v. 21, n. 5, p. 815–824, 2010.

DE SOUZA, A. P.; LEITE, D. C. C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M. G.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564–579, 2013.

DEESUKON, W.; NISHIMURA, Y.; SAKAMOTO, T.; SUKHUMSIRICHART, W. Purification, characterization of GH11 Endo- β -1,4-xylanase from thermotolerant *Streptomyces* sp. SWU10 and overexpression in *Pichia pastoris* KM71H. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 37–46, 2013.

DELABONA, P. S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos, 2011.

DELABONA, S.; SANCHEZ, C.; RIBEIRO, M.; FREITAS, S.; GERALDO, J. Bioresource Technology Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517–521, 2012.

DEMIRBAS, A. Waste management, waste resource facilities and waste conversion processes. **Energy Conversion and Management - Elsevier**, v. 52, p. 1280–1287, 2011.

DIAS, B. **Caracterização funcional e estrutural de uma β -glucanase GH12 de *Aspergillus terreus***. 2013. 76 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto. 2013.

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROCHA, G. J. M.; PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–8971, 2011.

DOS SANTOS, H. B.; BEZERRA, T. M. S.; PRADELLA, J. G. C.; DELABONA, P.; LIMA, D.; GOMES, E.; HARTSON, S. D.; ROGERS, J.; COUGER, B.; PRADE, R. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 103, 2016.

DUAN, X.; CHEN, J.; WU, J. Improving the Thermostability and Catalytic Efficiency of *Bacillus deramificans* Pullulanase by Site-Directed Mutagenesis. **Applied and Environmental Microbiology** p. v. 79, n. 13, p. 4072–4077, 2013.

DUMON, C.; VARVAK, A.; WALL, M. A.; FLINT, J. E.; LEWIS, R. J.; LAKEY, J. H.; MORLAND, C.; LUGINBU, P.; HEALEY, S.; TODARO, T.; DESANTIS, G.; SUN, M.; PARRA-GESSERT, L.; TAN, X.; WEINER, D. P.; GILBERT, H. J. Engineering Hyperthermostability into a GH11 Xylanase Is Mediated by Subtle Changes to Protein Structure *. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, n. 33, p. 22557–22564, 2008.

DUTRA, T. R.; GUIMARÃES, V. M.; VARELA, E. M.; DA SILVA FIALHO, L.; MILAGRES, A. M. F.; FALKOSKI, D. L.; ZANUNCIO, J. C.; DE REZENDE, S. T. A *Chrysosporthe cubensis* enzyme cocktail produced from a low-cost carbon source with high biomass hydrolysis efficiency. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

EVELEIGH, D. E. Cellulase: A Perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 321, n. 1561, p. 435–447, 1987.

F. SANGER, S. NICKLEN, A. A. R. C. The role and use of progestogens. **Biochemistry**, , v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

FERNANDES, S.; MURRY, P. G.; TUOHY, M. G. Enzyme Systems From the Thermophilic Fungus *Talaromyces emersonii* for Sugar Beet Bioconversion. **BioResources**, v. 3, n. 3, p. 898–909, 2008.

FURTADO, G. P.; RIBEIRO, L. F.; LOURENZONI, M. R.; WARD, R. J. A designed bifunctional laccase/ β -1,3-1,4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. **Protein Engineering, Design and Selection**. v. 26, n. 1, p. 15–23, 2013.

GAO, D.; UPPUGUNDLA, N.; CHUNDAWAT, S. P. S.; YU, X.; HERMANSON, S.; GOWDA, K.; BRUMM, P.; MEAD, D.; BALAN, V.; DALE, B. E. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. . **Biotechnol. Biofuels**. v 4, p. 1–11, 2011.

GARDES, M.; BRUNS, T. D.; PATHOLOGY, P. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, p. 113–118, 1993.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **International Union of Pure and Applied Chemistry Applied**, v. 59, n. 2, 1987.

GLOSTER, T. M.; IBATULLIN, F. M.; MACAULEY, K.; EKLÖF, J. M.; ROBERTS, S.; TURKENBURG, J. P.; BJØRNVAD, M. E.; JØRGENSEN, P. L.; DANIELSEN, S.; JOHANSEN, K. S.; BORCHERT, T. V.; WILSON, K. S.; BRUMER, H.; DAVIES, G. J. Characterization and three-dimensional structures of two distinct bacterial xyloglucanases from families GH5 and GH12. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 26, p. 19177–19189, 2007.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e Energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582–587, 2009.

GOLDSMITH, M.; TAWFIK, D. S. Directed enzyme evolution: Beyond the low-hanging fruit. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 22, n. 4, p. 406–412, 2012.

GOMES, D. J.; GOMES, J.; STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 87–94, 1994.

GOMES, I.; GOMES, J.; GOMES, D. J. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β -glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. p. 461–468, 2000.

GOMES, J.; TERLER, K.; KRATZER, R.; KAINZ, E.; STEINER, W. Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: Isolation, partial purification and characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 969–975, 2007.

GRAJEK, W. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 126–129, 1987.

GUIMARÃES, J. L.; FROLLINI, E.; DA SILVA, C. G.; WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K. G. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 407–415, 2009.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, 2003.

HAMANN, P. R. V.; SERPA, D. L.; BARRETO DA CUNHA, A. S.; DE CAMARGO, B. R.; OSIRO, K. O.; VALLE DE SOUSA, M.; FELIX, C. R.; MILLER, R. N. G.; NORONHA, E. F. Evaluation of plant cell wall degrading enzyme production by *Clostridium thermocellum* B8 in the presence of raw agricultural wastes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 105, p. 97–105, 2015.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384–410, 2005.

HARGREAVES, P.; JR, N. P. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana.** 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

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

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213–218, 2002.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11206–10, 2006.

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 358–364, 1999.

HIRAS, J.; WU, Y. W.; DENG, K.; NICORA, C. D.; ALDRICH, J. T.; FREY, D.; KOLINKO, S.; ROBINSON, E. W.; JACOBS, J. M.; ADAMS, P. D.; NORTHERN, T. R.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. Comparative community proteomics demonstrates the unexpected importance of actinobacterial glycoside hydrolase family 12 protein for crystalline cellulose hydrolysis. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 2016.

HOANG, N. V.; FURTADO, A.; BOTHA, F. C.; SIMMONS, B. A.; HENRY, R. J. Potential for Genetic Improvement of Sugarcane as a Source of Biomass for Biofuels. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 182, 2015.

HOFFMAM, Z. B.; ZANPHORLIN, L. M.; COTA, J.; DIOGO, J. A.; ALMEIDA, G. B.; DAMÁSIO, A. R. L.; SQUINA, F.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R. Xylan-specific carbohydrate-binding module belonging to family 6 enhances the catalytic performance of a GH11 endo-xylanase. **New Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 467–472, 2016.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. **Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species**. 1. ed: Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved., 2014. v. 86.

HOUBRAKEN, J.; GIRAUD, S.; MEIJER, M.; BERTOUT, S.; FRISVAD, J. C.; MEIS, J. F.; BOUCHARA, J. P.; SAMSON, R. A. Taxonomy and Antifungal Susceptibility of Clinically Important. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 22–30, 2013.

HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; FRISVAD, J. C. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 403–421, 2012.

HOUBRAKEN J, SAMSON RA. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**. 2011;70:1-51.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN, Van R. E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602–619, 2003.

HSIEH, Y. S. Y.; HARRIS, P. J. Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. **Molecular Plant**, v. 2, n. 5, p. 943–965, 2009.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN, Van R. E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602–619, 2003.

HU, J.; ARANTES, V.; PRIBOWO, A.; SADDLER, J. N. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 112, 2013.

HU, J.; DAVIES, J. A.; MOK, Y. K.; GENE, B.; LEE, Q. F.; ARATO, C.; SADDLER, J. N. Enzymatic hydrolysis of industrial derived xylo-oligomers to monomeric sugars for pilot plant scale glycol production. 2016.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Tellmaps statistics IEA. Disponível em: <<http://energyatlas.iea.org/#!/tellmap/-1076250891/1>>. Acesso em: 30 fev. 2017.

ISOGAI, A. **Wood nanocelluloses: Fundamentals and applications as new bio-based nanomaterials** **Journal of Wood Science**, 2014.

JANG, H. Der; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces transformant* T3-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 263–268, 2003.

JOHRI B. N, SATYANARAYANA T, OLSEN J. **Thermophilic molds in biotechnology**. p. 354UK: Kluwer Academic Publishers. Juturu. 1999. Dordrecht ; London: Kluwer Academic Publishers, 1999.

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

JØRGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 — Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 381–390, 2006.

KALLIOINEN, A.; PURANEN, T.; SIIKA-AHO, M. Mixtures of thermostable enzymes show high performance in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 5, p. 1038–1056, 2014.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1099–1104, 2003.

KARNAOURI, A.; MATSAKAS, L.; TOPAKAS, E.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. Development of thermophilic tailor-made enzyme mixtures for the bioconversion of agricultural and forest residues. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–14, 2016.

KAWAMORI, M.; TAKAYAMA, K. ichiro; TAKASAWA, S. Production of Cellulases by a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus* A-131. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 647–654, 1987.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

KIRK, K. . Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465–505, 1987.

KIDDINAMOORTHY, J.; ANCENO, A. J.; HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Production, purification and characterization of *Bacillus* sp. GRE7 xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulp biobleaching. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 605–612, 2008.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

KOLASA, M.; AHRING, B. K.; LÜBECK, P. S.; LÜBECK, M. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 143–148, 2014.

LAGAERT, S.; BELIËN, T.; VOLCKAERT, G. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 9, p. 1064–1073, 2009.

- LARKIN M, BLACKSHIELDS G, BROWN N, CHENNA R, MCGETTIGAN P, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE I, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON J, GIBSON T, HIGGINS D (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics** 23:2947–2948
- LEE, J.-W.; GWAK, K.-S.; PARK, J.-Y.; PARK, M.-J.; CHOI, D.-H.; KWON, M.; CHOI, I.-G. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 45, n. 6, p. 485–491, 2007.
- LEE, K. M.; KALYANI, D.; TIWARI, M. K.; KIM, T. S.; DHIMAN, S. S.; LEE, J. K.; KIM, I. W. Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, , v. 123, p. 636–645, 2012.
- LYND, L. R. WEIMER, P. J.; VAN Z.; PRETORIUS. W. H, I. S.; **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology** LEE R. LYND, PAUL J. WEIMER, WILLEM H. VAN ZYL; ISAK S. Pretorius *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, 66(3):506.
- LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. **Scientific World Journal**, v. 2014.
- LEE, Y. J.; KIM, B. K.; LEE, B. H.; JO, K. I.; LEE, N. K.; CHUNG, C. H.; LEE, Y. C.; LEE, J. W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 378–386, 2008.
- LEVASSEUR, A.; DRULA, E.; LOMBARD, V.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2013.
- LIANG, C.; XUE, Y.; FIORONI, M.; RODRÍGUEZ-ROPERO, F.; ZHOU, C.; SCHWANEBERG, U.; MA, Y. Cloning and characterization of a thermostable and halo-tolerant endoglucanase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. **Applied Microbiology and Biotechnology**, , v. 89, n. 2, p. 315–326, 2011.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.
- MA, F.; YANG, N.; XU, C.; YU, H.; WU, J.; ZHANG, X. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9600–9604, 2010.
- MAĆZYŃSKA, J.; KRZYWONOS, M.; KUPCZYK, A.; TUCKI, K.; SIKORA, M.; PIŃKOWSKA, H.; BĄCZYK, A.; WIELEWSKA, I. Production and use of biofuels for transport in Poland and Brazil – The case of bioethanol. **Fuel**, v. 241, n. September 2018, p. 989–996, 2019.

MADHAVAN, A.; TAMALAMPUDI, S.; USHIDA, K.; KANAI, D.; KATAHIRA, S.; SRIVASTAVA, A.; FUKUDA, H.; BISARIA, V. S.; KONDO, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1067–1078, 2009.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461–488, 2000.

MAITY, S. K. Opportunities , recent trends and challenges of integrated biore fi nery : Part I. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1427–1445, 2015.

MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, , v. 5, n. 5, p. 500–516, 2009.

MANJU, S.; SINGH CHADHA, B. **Production of hemicellulolytic enzymes for hydrolysis of lignocellulosic biomass**. 1. ed. Elsevier Inc., 2011.

MARTÍNEZ, P. M.; APPELDOORN, M. M.; GRUPPEN, H.; KABEL, M. A. The two *Rasamsonia emersonii* α -glucuronidases, ReGH67 and ReGH115, show a different mode-of-action towards glucuronoxylan and glucuronoxyloligosaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2016.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949–954, 2002. a.

MARTINS, L. O.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M. M.; TEIXEIRA, M.; COSTA, T.; JONES, G. H.; HENRIQUES, A. O. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 21, p. 18849–18859, 2002. b.

MARTOS, M. A.; ZUBRESKI, E. R.; GARRO, O. A.; HOURS, R. A. Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. **Biotechnology Research International**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C. F.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1–10, 2011.

MELO, R. R. D. **Study of bacterial glycoside hydrolases for biotechnological applications : bioprospection , production and immobilization**. 2017. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas. 2017.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL H.; RODRIGO S. R. LEITE, R. S. R.; ZANPHORLIN, L. M.; OKAMOTO, D. M.; BONILLA, G. O. R.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9210–9217, 2009.

MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1387–1391, 2004.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Pioneering Research Division**, 1959.

MINIC, Z.; JOUANIN, L. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 7–9, p. 435–449, 2006.

MOHAMED, S. A.; FARID, N. M.; HOSSINY, E. N.; BASSUINY, R. I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 1, p. 54–64, 2006.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008.

MONTE, J. R.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Use of a mixture of thermophilic enzymes produced by the fungus *Thermoascus aurantiacus* to enhance the enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse cellulose. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 5, n. 4, p. 468–476, 2010.

MORENO, A.; IBARRA, D.; MIALON, A.; BALLESTEROS, M. A Bacterial Laccase for Enhancing Saccharification and Ethanol Fermentation of Steam-Pretreated Biomass. **Fermentation**, v. 2, n. 4, p. 11, 2016.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062–1071, 2012.

MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; TSANG, A. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: From dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 471–481, 2014.

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

MOUCHACCA, J. Thermotolerant fungi erroneously reported in applied research work as possessing thermophilic attributes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 8–9, p. 869–880, 2000. a.

MOUCHACCA, J. Thermophilic fungi and applied research: A synopsis of name changes and synonymies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 8–9, p. 881–888, 2000. b.

MOVIO, A. P. **Aplicações de coquetéis de celulases para a sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto. 2014.

MURPHY, C.; POWLOWSKI, J.; WU, M.; BUTLER, G.; TSANG, A. Curation of characterized glycoside hydrolases of Fungal origin. **Database**, v. 2011, p. 1–14, 2011.

NANDA, S.; MOHAMMAD, J.; REDDY, S. N.; KOZINSKI, J. A.; DALAI, A. K. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**, , v. 4, n. 2, p. 157–191, 2014.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; KUMAR, K.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 150–161, 2014.

NIEHAUS, F.; NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; BERTOLDO, C.; KÄHLER, M.; KÄHLER, M.; ANTRANIKIAN, G.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 711–729, 1999.

MOREIRA, L. R. S.; MILANEZI, N. V. G.; FERREIRA FILHO, E. X. Enzymology of plant cell wall breakdown: an update. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. **Routes to cellulosic ethanol**. 1ª edição, New York: Springer, p. 73-96, 2011

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011.

NOVOZYMES. Novozymes Cellic® CTec3 - Secure your plant's lowest total cost. **Novozymes**, p. 1–6, 2012.

PINTO, OKUBO, T. **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), São José do Rio Preto.

OHNO N, FXJKLIDA H, WANO H, KASAMIJRA M, SEIDIOYAU H, FUM T, Amylases produced by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and some of their properties. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 76: 3–4. 1998.

PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564–592, 2012.

PALOHEIMO, M.; HAARMANN, T.; MÄKINEN, S. Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei* **Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications**. p. 23-58 2016.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000.

PAPA, G.; VARANASI, P.; SUN, L.; CHENG, G.; STAVILA, V.; HOLMES, B.; SIMMONS, B. A.; ADANI, F.; SINGH, S. Exploring the effect of different plant lignin content and composition on ionic liquid pretreatment efficiency and enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus* L. mutants. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 352–359, 2012.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 559–568, 2008.

PEDERSEN, M.; JOHANSEN, K. S.; MEYER, A. S. Low temperature lignocellulose pretreatment: Effects and interactions of pretreatment pH are critical for maximizing enzymatic monosaccharide yields from wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4. 2011.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

PERKINS JB, KUMAR M, VAN ZIJL MFK, et al. *Talaromyces* strains and enzyme compositions. **Google Patents**; 2010.

PERKINS, J. B.; KUMAR, M.; ZIJL, V. M. F. K.; VOLLEBREGT, A. W. H.; SARANTINOPOULOS, P. *Talaromyces* strains and enzyme compositions. **EP2896686A1 European Patent Office**, , v. 1, n. 19, p. 1–55, 2015.

PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I. C.; MENOSSE, M.; DOS SANTOS, R. R.; FILHO, S. O.; PENNA, T. C. V. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 121–124, p. 59–70, 2005.

PETROVIČ, U. Next-generation biofuels: a new challenge for yeast. **Yeast**, v. 32, n. 9, p. 583–593, 2015.

PHILLIPS, C. M.; BEESON, W. T.; CATE, J. H.; MARLETTA, M. A. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 12, p. 1399–1406, 2011.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. Industrial enzymes – structure, function and applications. 1ª edição, Dordrecht: Springer, 641 p, 2007.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PULLAN, S. T.; DALY, P.; DELMAS, S.; IBBETT, R.; KOKOLSKI, M.; NEITELER, A.; VAN MUNSTER, J. M.; WILSON, R.; BLYTHE, M. J.; GADDIPATI, S.; TUCKER, G. A.; ARCHER, D. B. RNA-sequencing reveals the complexities of the transcriptional response to lignocellulosic biofuel substrates in *Aspergillus niger*. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 3, 2014.

RAKOTOARIVONINA, H.; HERMANT, B.; MONTHE, N.; RÉMOND, C. The hemicellulolytic enzyme arsenal of *Thermobacillus xylanilyticus* depends on the composition of biomass used for growth. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–12, 2012.

RAMOS, L. P. Revisão. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials, v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, p. 30, 2016.

RAMOS, F. C. **Avaliação da termoestabilidade e aplicação biotecnológica de endo-xilanases GH11 obtidas por otimização in silico**. 2017. 83 f Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) São José do Rio Preto, 2017.

REYES-SOSA, F. M.; LÓPEZ MORALES, M.; PLATERO GÓMEZ, A. I.; VALBUENA CRESPO, N.; SÁNCHEZ ZAMORANO, L.; ROCHA-MARTÍN, J.; MOLINA-HEREDIA, F. P.; DÍEZ GARCÍA, B. Management of enzyme diversity in high-performance cellulolytic cocktails. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A. De; MAZIERO, P.; RIBEIRO, E. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility **Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanc**, v. 54, n. November, 2011.

RIBEIRO, L. F.; FURTADO, G. P.; LOURENZONI, M. R.; COSTA-FILHO, A. J.; SANTOS, C. R.; PEIXOTO NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. A.; POLIZELI, M. D. L. T. M.; MURAKAMI, M. T.; WARD, R. J. Engineering bifunctional laccase-xylanase chimeras for improved catalytic performance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 43026–43038, 2011.

ROSA, I. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) 2014. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto. 2014.

ROSGAARD, L.; PEDERSEN, S.; CHERRY, J. R.; HARRIS, P.; MEYER, A. S. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 2, p. 493–498, 2006.

ROTH, S.; SPIESS, A. C. Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 12, p. 2285–2313, 2015.

RUBIO, M. V.; ZUBIETA, M. P.; FRANCO CAIRO, J. P. L.; CALZADO, F.; PAES LEME, A. F.; SQUINA, F. M.; PRADE, R. A.; DE LIMA DAMÁSIO, A. R. Mapping N-linked glycosylation of carbohydrate-active enzymes in the secretome of *Aspergillus nidulans* grown on lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2016.

RULLER, R., DELIBERTO, L., FERREIRA, T. L., & WARD, R. J. Thermostable variants of the recombinant xylanase A from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution show reduced heat capacity changes. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 70 (4), n. April, p. 1280–1293, 2008.

RULLER, R.; ALPONTI, J.; ZANPHORLIN, M.; MACHADO, C. B.; WARD, R. J. Concomitant adaptation of a GH11 xylanase by directed evolution to create an alkali-tolerant / thermophilic enzyme. **Protein Engineering, Design & Selection** v. 27, n. 8, p. 255–262, 2014.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances** v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SALAR, R. K.; ANEJA, K. R. Thermophilic fungi: taxonomy and biogeography. **Journal of Agricultural Technology**, v. 3, n. 1, p. 77–107, 2007.

SANDGREN, M.; GUALFETTI, P. J.; SHAW, A.; GROSS, L. S.; SALDAJENO, M.; DAY, A. G.; JONES, T. A.; MITCHINSON, C. Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for thermal stability. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 12, n. 4, p. 848–860, 2003.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Elmsford, v. 89, n. 3, p. 246–291, 2005.

SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C.; MARIA, A.; MILAGRES, F. Kinetics of the solid state fermentation of sugarcane bagasse by. **Chemical Engineering**, p. 13–16, 2003.

SCHAGGER, H.; GEBHARD, J. VON. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. v. 379, n. 1 1987, p. 368–379, 1987.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SCHNEIDER, W. D. H.; GONÇALVES, T. A.; UCHIMA, C. A.; COUGER, M. B.; PRADE, R.; SQUINA, F. M.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–26, 2016.

SCHUERG, T.; GABRIEL, R.; BAECKER, N.; BAKER, S. E.; SINGER, S. W. *Thermoascus aurantiacus* is an Intriguing Host for the Industrial Production of Cellulases. **Current Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 89–97, 2017. a.

SCHUERG, T.; PRAHL, J. P.; GABRIEL, R.; HARTH, S.; TACHEA, F.; CHEN, C. S.; MILLER, M.; MASSON, F.; HE, Q.; BROWN, S.; MIRSHIAGHI, M.; LIANG, L.; TOM, L. M.; TANJORE, D.; SUN, N.; PRAY, T. R.; SINGER, S. W. Xylose induces cellulase production in *Thermoascus aurantiacus*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017. b.

SCHNEIDER, W. D. H.; GONÇALVES, T. A.; UCHIMA, C. A.; COUGER, M. B.; PRADE, R.; SQUINA, F. M.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–26, 2016.

SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R. A.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; YU, T.-H. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5867, p. 1238–40, 2008.

SHABEB, M. S. A.; YOUNIS, M. A. M.; HEZAYEN, F. F.; NOUR-ELDEIN, M. A. Production of cellulase in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain. **Word Applied Sciences Jornal**, p. 35–42, 2010.

SHAHEEN, M.; CHOI, M.; ANG, W.; ZHAO, Y.; XING, J.; YANG, R.; XING, J.; ZHANG, J.; CHEN, J. Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 57, p. 462–468, 2013.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

SHRINIVAS, D.; SAVITHA, G.; RAVIRANJAN, K.; NAIK, G. R. A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 suitable for paper and pulp industry: Purification and characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 2049–2057, 2010.

SINGHANIAA, R. R.; SUKUMARANA, R. K.; PATELB, A. K.; LARROCHEB, C. Enzyme and Microbial Technology Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; DA SILVA BON, E. P.; DE MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. de A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 27–32, 2007.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; DA SILVA BON, E. P.; DE MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. de A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.

SONG, L.; SIGUIER, B.; DUMON, C.; BOZONNET, S.; DONOHUE, M. J. O. Engineering better biomass-degrading ability into a GH11 xylanase using a directed evolution strategy., p. 1–16, 2012.

SØRENSEN, A.; TELLER, P. J.; LÜBECK, P. S. Onsite Enzyme Production During Bioethanol Production from Biomass : Screening for Suitable Fungal Strains. **Appl Biochem Biotechnol** p. 1058–1070, 2011.

SØRENSEN, H. R.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 908–918, 2007.

SOUZA, T. **Diversidade de fungos filamentosos termófilos em composto para cultivo de *Agaricus brasiliensis***. 2010. Universidade Federal de Lavras , 2010.

STRAW, W.; SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified. p. 449–453, 2006.

STRICKER, A. R.; TREFFLINGER, P.; ARO, N.; PENTTILA, M.; MACH, R. L. Role of Ace2 (Activator of Cellulases 2) within the xyn2 transcriptosome of *Hypocrea jecorina*, **Fungal Genetics and Biology** v. 45, p. 436–445, 2008.

STUDER, M. H.; DEMARTINI, J. D.; DAVIS, M. F.; SYKES, R. W.; DAVISON, B.; KELLER, M.; TUSKAN, G. A.; WYMAN, C. E. Lignin content in natural populus variants affects sugar release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 15, p. 6300–6305, 2011.

SU, Y. Y.; CAI, L. *Rasamsonia composticola*, a new thermophilic species isolated from compost in Yunnan, China. **Mycological Progress**, v. 12, n. 2, p. 213–221, 2012.

SUBRAMANIAM, R. AND VIMALA, R. Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances : a Comparative Study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480–486, 2012.

SUN, Y.; CHENG, J. β 2006 Wiley Periodicals, Inc. **Biotechnology and Bioengineering**, : a review q. v. 83, p. 1–11, 2002.

SWEENEY, M. D.; XU, F. Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. **Catalysts**, v. 2, n. 2, p. 244–263, 2012.

SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95–101, 2014.

TAYLOR, M. P.; ELEY, K. L.; MARTIN, S.; TUFFIN, M. I.; BURTON, S. G.; COWAN, D. A. Thermophilic ethanologenes: future prospects for second-generation bioethanol production. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 398–405, 2009.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, , v. 1, n. May, p. 19–26, 1994..

TISHKOV, V. I.; GUSAKOV, A. V.; CHERKASHINA, A. S.; SINITSYN, A. P. Engineering the pH-optimum of activity of the GH12 family endoglucanase by site-directed mutagenesis. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1704–1710, 2013.

TUOHY, M. G.; LAFFEY, C. D.; COUGHLAN, M. P. Characterization of the individual components of the xylanolytic enzyme system of *Talaromyces emersonii*. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 37–42, 1994.

VAN DEN BRINK, D. M.; BANERJI, O.; TEAR, G. Commissureless Regulation of Axon Outgrowth across the Midline Is Independent of Rab Function. **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

VAN NOORT, V.; BRADATSCH, B.; ARUMUGAM, M.; AMLACHER, S.; BANGE, G.; CREEVEY, C.; FALK, S.; MENDE, D. R.; SINNING, I.; HURT, E.; BORK, P. Consistent mutational paths predict eukaryotic thermostability. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, 2013.

VAN SOLINGEN, P.; MEIJER, D.; VAN DER KLEIJ, W. A. H.; BARNETT, C.; BOLLE, R.; POWER, S. D.; JONES, B. E. Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycete isolated from an East African soda lake. **Extremophiles**, v. 5, n. 5, p. 333–341, 2001.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3–4, p. 185–193, 2010.

VENTORINO, V.; IONATA, E.; BIROLO, L.; MONTELLA, S.; MARCOLONGO, L.; DE CHIARO, A.; ESPRESSO, F.; FARACO, V.; PEPE, O. Lignocellulose-Adapted Endo-Cellulase Producing *Streptomyces* strains for Bioconversion of Cellulose-Based Materials. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 2061, p. 1–15, 2016.

VIDYALAKSHMI, R.; PARANTHAMAN, R.; INDHUMATHI, J. Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. **World Journal of Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 89–91, 2009.

VIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. June, p. 121–145, 2007.

VISSER, E.; LEAL, T.; DE ALMEIDA, M.; GUIMARÃES, V. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 5, 2015.

VISSER, H. JOOSTEN, V.. PUNT, P. GUSAKOV, A. V. OLSON, P. T.; JOOSTEN, R. BARTELS, J. VISSER, J. J. SINITSYN, J. EMALFARB, M. A. VERDOES, J. C. WERY. J.. Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a. April, p. 214–223, 2011.

VISSER E. M.; FALKOSKI, D. L. ALMEIDA, M. N.; MAITAN-ALFENAS, G. P. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 587–594, 2013.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4ª edição, Porto Alegre: Artmed, 1481p, 2013.

WATERS, D. M.; MURRAY, P. G.; RYAN, L. A.; ARENDT, E. K.; TUOHY, M. G. Talaromyces emersonii thermostable enzyme systems and their applications in wheat baking systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7415–7422, 2010.

WESTERENG, B.; CANNELLA, D.; WITTRUP AGGER, J.; JØRGENSEN, H.; LARSEN ANDERSEN, M.; EIJSINK, V. G. H.; FELBY, C. Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. **Scientific Reports**, v. 5, n. November, p. 1–9, 2015.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18 SPEC. ISS., p. 1959–1966, 2005.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 2009.

YAN, S.; LI, T.; YAO, L. Mutational effects on the catalytic mechanism of cellobiohydrolase i from *Trichoderma reesei*. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 17, p. 4982–4989, 2011.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; MACKIE, R. I.; CANN, I. K. O. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in applied microbiology**, v. 70, n. 10, p. 1–55, 2010.

ZHANG, J. et al. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, , v. 4, n. 1, p. 12, 2011. a.

ZHANG, J.; MOILANEN, U.; TANG, M.; VIKARI, L. The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2013.

ZHANG, J.; TUOMAINEN, P.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9090–9095, 2011. b.

ZHAO, Z.; LIU, H.; WANG, C.; XU, J. R. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2013.

XUE, L.; ZHANG, P.; SHU, H.; WANG, R.; ZHANG, S.; ZHANG, S. Agricultural Waste. **Water Environment Research**, v. 88, n. 10, p. 1334–1369, 2016.