



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 banco de 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> RUT C30.....	101
Tabela 7. Comparação dos parâmetros cinéticos, temperatura desnaturação térmica (T_m), 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	Pectinálise
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 , XBS ^{M6} e XBS ^{M6K99E}	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 GH11 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).

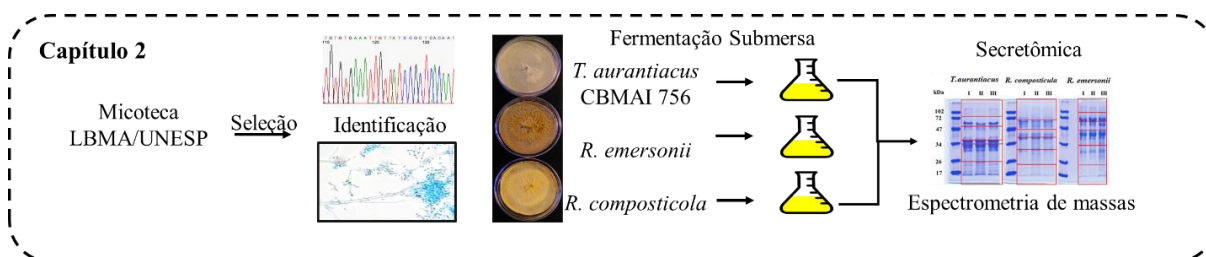
Neste contexto, este trabalho buscou desenvolver novos coquetéis enzimáticos termofílicos a partir da seleção e investigação de cepas fúngicas produtoras de enzimas envolvidas na desconstrução da biomassa. Além disso, com enfoque no aumento do rendimento da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar,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

2. ESTRUTURA DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em uma breve introdução seguida do (**Capítulo 1**) que contém uma revisão de literatura para contextualizar a problemática no qual o tema estudado se enquadra. Por conseguinte, os resultados obtidos foram divididos em quatro capítulos. Cada capítulo é composto por um resumo, uma breve introdução, material e métodos, resultados, discussão e, por fim, uma conclusão.

Em detalhes, o **Capítulo 2** aborda os resultados da primeira etapa do trabalho, referente a uma triagem da micoteca da UNESP/IBILCE (Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada). Neste capítulo, foram selecionados potenciais fungos termofílicos para a produção de celulasas e hemicelulasas através da fermentação sólida e submersa em material lignocelulósico como indutor. A partir das atividades enzimáticas pesquisada nos extratos produzidos em fermentação submersa, foram ranqueadas dois principais isolados e comparados com a potencial cepa de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. Estes fungos termofílicos foram identificados por sequenciamento do gene ITS, como *Rasamsonia emersonii* (COQ) e *Rasamsonia composticola* (FMG6). Pela metodologia de espectrometria de massas foi identificado o repertório completo de CAZymes, secretadas em material lignocelulósicos altamente complexo (uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo).

Fluxograma 1. Esquema ilustrativo das principais metodologias utilizadas no capítulo 2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No **Capítulo 3**, foi avaliada a eficiência da sacarificação de biomassa de alta recalcitrância (bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e bagaços pré-tratados), com os coquetéis dos fungos termofílicos: *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. Emersonii* COQ, *R. Composticola* FMG6, o controle CELLIC® CTec2 e suas combinações. Para a avaliação da sacarificação dos extratos, foram realizados ensaios em dois estágios: estágio 1 para *screening* inicial (1 mL) e estágio 2 em uma escala maior (50 mL) para os coquetéis selecionados. Substratos comerciais sintéticos foram utilizados para a dosagem das atividades enzimáticas produzidas

pelos coquetéis selecionados neste capítulo. Esse painel de substrato permitiu a caracterização de cada coquetel, juntamente com a avaliação de atividades enzimáticas deficientes e melhoradas.

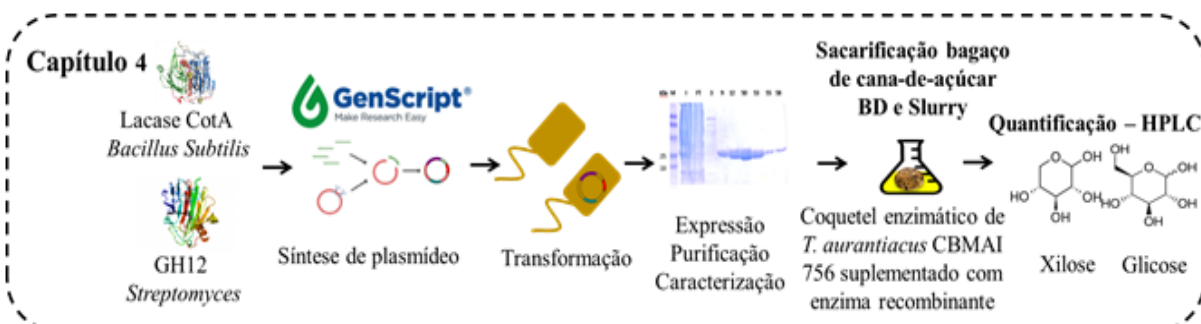
Fluxograma 2. Esquema ilustrativo das principais metodologias utilizadas no capítulo 3.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O **Capítulo 4** abordou a suplementação do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com enzimas recombinantes selecionadas estrategicamente para a melhorar o potencial de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Enzimas ausentes no secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756, como uma endoglucanase e uma lacase, foram avaliadas. As enzimas recombinantes GH12 de *Streptomyces* sp. e lacase de *Bacillus subtilis* (CotA) foram selecionadas pela sua atuação nas condições do extrato enzimático do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756. Essas enzimas foram expressas, purificadas e suplementadas em diferentes concentrações. A glicose e a xilose foram quantificadas para a avaliação da contribuição destas enzimas na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Fluxograma 3. Esquema ilustrativo das principais metodologias utilizadas no capítulo 4.



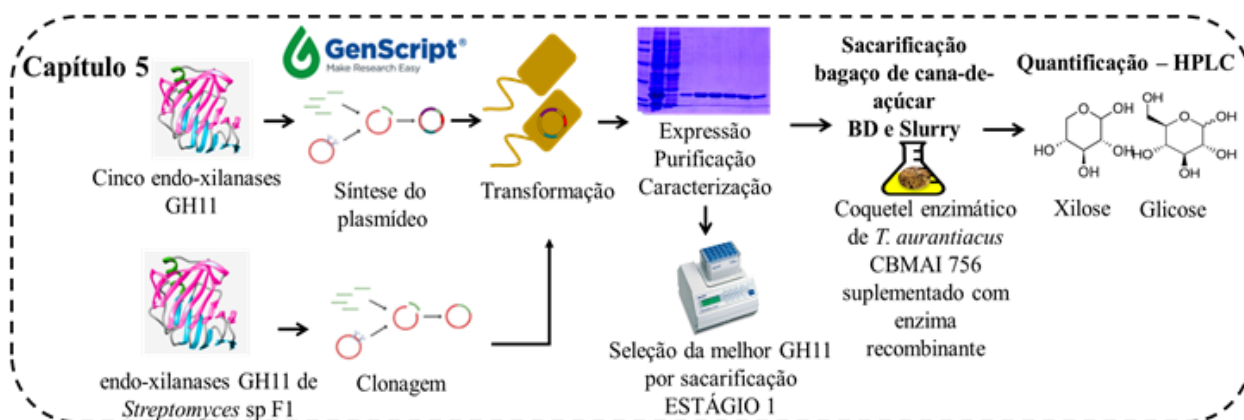
Fonte: Elaborado pelo autor.

O **Capítulo 5** abordou a seleção de uma eficiente endo-xilanase GH11 para suplementar o coquetel enzimático termofílico de *T. aurantiacus* CBMAI 756, deficiente dessa enzima. Neste capítulo, avaliamos as endo-xilanases GH11ST, clonada neste estudo através da cepa de *Streptomyces* F1, três endo-xilanases termoestáveis - sendo uma enzima nativa encontrada em metagenoma denominada XAT e duas mutantes (XAT^{M7} e XAT^{M12}), além de duas endo-xilanases mutantes de *Bacillus subtilis* (XBS^{M6} e XBS^{M6K99E}).

Estas foram expressas, purificadas, caracterizadas e testadas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar a fim de estabelecer a relevância das mutações para obtenção de termoestabilidade e eficiência de catalítica na aplicação deste bioprocesso.

Por fim, a enzima mutante XAT^{M12}, desenvolvida com 12 mutações que aumentaram sua termoestabilidade, mostrou-se a mais eficiente nas condições do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756. A endo-xilanase XAT^{M12} foi testada em três concentrações na suplementação do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756. A glicose e a xilose foram quantificadas para a avaliação da contribuição da enzima XAT^{M12} na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Fluxograma 4. Esquema ilustrativo das principais metodologias utilizadas no capítulo 5.



Fonte: Elaborado pelo autor.

*CAPÍTULO 1***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Etanol como biocombustível

Pesquisadores ao redor do mundo buscam por alternativas aos combustíveis fósseis que proporcionam segurança energética e sustentabilidade, sobretudo em virtude dos problemas ambientais ligados ao uso extensivo dos combustíveis fósseis, como declínio das reservas de petróleo, além dos impasses político-econômicos relacionados com o controle de combustíveis fósseis (NIGAM; SINGH, 2011; PETROVIČ, 2015).

No Brasil, a utilização de biocombustíveis se iniciou com a obtenção do E1G a partir do caldo da cana-de-açúcar (sacarose). O etanol E1G, impulsionado pela criação do Programa Nacional do Alcool (PróAlcool) em 1975, reduziu significativamente a importação de petróleo e a emissão de CO₂ contribuindo para que, em 2014, 44% da matriz energética brasileira fosse renovável, sendo que 13,5% deste percentual correspondem à energia proveniente da cana-de-açúcar (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2014; SOCCOL et al., 2010).

No entanto, para atender o mercado crescente de biocombustíveis, uma expansão de áreas cultivadas de cana-de-açúcar é inevitável (DIAS et al., 2011; SOCCOL et al., 2010). A expansão de área plantada, além de causar impactos ambientais, provocam conflitos econômico-sociais, pois existe uma preocupação com a competição entre culturas bioenergéticas e alimentares em relação às áreas cultiváveis. Esta condição pode resultar na elevação do preço de determinados gêneros alimentícios (BELEN et al., 2015; HILL et al., 2006; SEARCHINGER et al., 2008).

A utilização de biomassas não comestíveis para a produção de combustível elimina uma importante problemática inerente aos combustíveis de primeira geração: o aumento do preço de alguns gêneros alimentícios decorrente da competição por áreas para produção de alimentos, complicação esta capaz de comprometer a segurança alimentar (NIGAM; SINGH, 2011).

Dentre as várias vertentes para aumentar a produtividade por área plantada do bagaço de cana-de-açúcar, o E2G, produzido a partir de resíduos agrícolas, tem se destacado economicamente e ambientalmente (DIAS et al., 2011; PESSOA-JR et al., 2005).

3.2. Etanol de segunda geração

O interesse na aplicação de biomassas para bioenergia tem recebido maior atenção em relação aos biocombustíveis líquidos para o setor de transportes, como é o caso do E2G (GOLDEMBERG, 2009).

O E2G é obtido a partir de biomassas lignocelulósicas, tal como resíduos agrícolas. É também denominado etanol celulósico por ser resultado da conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, condição que o diferencia do E1G, produzido a partir de açúcar e amido (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; HILL et al., 2006; NIGAM; SINGH, 2011).

Em virtude da utilização de resíduos, o E2G apresenta vantagens em relação ao de primeira geração. Dentre estas vantagens, destaca-se a utilização de uma matéria-prima renovável amplamente disponível, menos dispendiosa, representando benefícios econômicos e ambientais (ALVIRA et al., 2010; BELEN et al., 2015; HILL et al., 2006).

A proposta do etanol de segunda geração é focada na valorização da biomassa. De modo semelhante ao que é feito na refinaria de petróleo com a utilização de todas as frações do material bruto, busca-se com o etanol de segunda geração reaproveitar todas as porções da cultura energética, o que inclui sua biomassa residual. No Brasil, essa abordagem é atendida pela utilização de bagaço de cana-de-açúcar, resíduo amplamente disponível nas usinas de processamento do E1G (DIAS et al., 2011). Em torno de 10 milhões de toneladas de bagaço podem produzir 600 milhões de barris de etanol, cerca de 3 mil litros por hectare de cana-de-açúcar plantada (HOANG et al., 2015; SOCCOL et al., 2010).

No Brasil, a implantação da produção do etanol celulósico é ainda favorecida pela possibilidade de compartilhar parte da infraestrutura do E1G. Desse modo, implantar o E2G requer investimentos reduzidos quanto as instalações, logísticas e demandas de energia (DEMIRBAS, 2011; DIAS et al., 2011; SOCCOL et al., 2010). Neste sentido, subsídios governamentais são aplicados para incentivar a produção de biocombustíveis economicamente não competitivos e que apresentam benefícios ambientais significativos para a sociedade. Tal prática se justifica frente aos custos ambientais dos combustíveis fósseis que não são considerados na composição o seu preço de mercado (HILL et al., 2006).

Devido à recalcitrância da biomassa lignocelulósica, sua bioconversão em etanol exige etapas adicionais quando comparada ao etanol obtido de açúcar e amido. O processo produtivo do E2G é composto pelas seguintes etapas: pré-tratamento da biomassa, hidrólise ou sacarificação do material pré-tratado, fermentação dos açúcares obtidos e a destilação do fermentado (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; SOCCOL et al., 2010).

Diferente do processo de obtenção de E1G, em que o caldo é fermentado e destilado, o processo do etanol de segunda geração envolve o pré-tratamento e a hidrólise preliminar da biomassa. O pré-tratamento visa principalmente a deslignificação do material para a liberação de celulose e hemicelulose, tornando-as mais acessíveis para a hidrólise enzimática e obtenção de monossacarídeos que podem então ser direcionados para a fermentação (PÉREZ et al., 2002; VENTORINO et al., 2016).

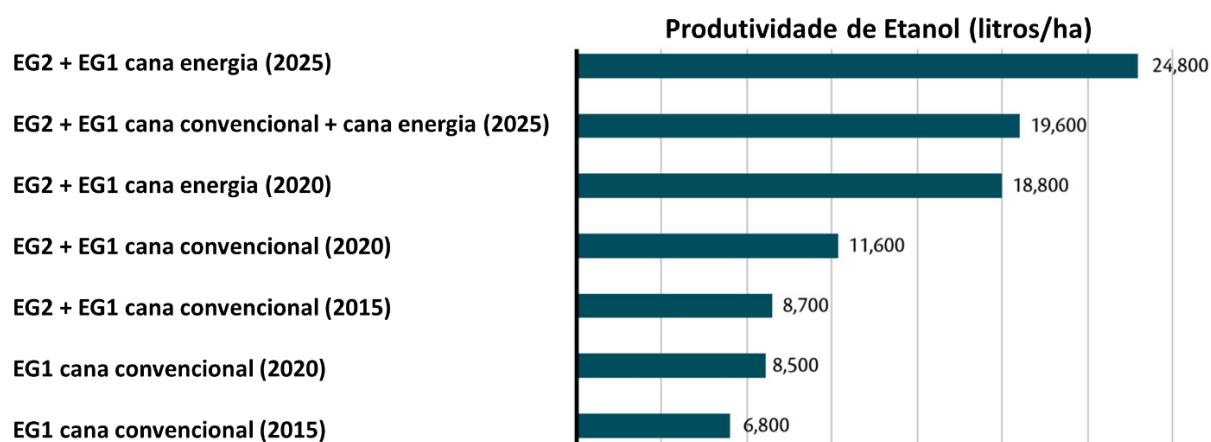
Embora resíduos agrícolas possam ser convertidos em combustível, existem etapas do processo que tornam economicamente inviável para a comercialização do produto, de modo a atender a demanda por combustível. Isto ocorre devido a barreiras tecnológicas e econômicas para a conversão de biomassa em etanol (ALVIRA et al., 2010; SÁNCHEZ, 2009; SCHUERG et al., 2017a). Desta forma, atesta-se a necessidade de pesquisas que visam aprimorar o processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (NIGAM; SINGH, 2011).

3.2.1. Perspectivas para o etanol de segunda geração

O Brasil tem a mais longa história de sucesso em termos de biocombustíveis e atualmente é líder mundial em uso de energia a partir de fontes renováveis de energia. A participação de energia renovável no seu consumo total de energia está no nível de 42%, sendo que 18% da energia utilizada é a bioenergia proveniente da cana-de-açúcar (bioetanol) (MAĆZYŃSKA et al., 2019).

Embora já sustentável, a agroindústria da cana-de-açúcar ainda pode obter maior eficiência e ganhos de produtividade. O setor brasileiro de agricultura, indústria e gestão mostram duas tecnologias que resultaram em avanços marcantes: 1) a produção de E2G que emprega os resíduos lignocelulósicos, do cultivo e processamento da cana-de-açúcar excedente do E1G, e 2) a criação e seleção de variedades de cana-de-açúcar com alta produtividade e alto teor de fibras "cana energia", que provavelmente resultarão em expressivos ganhos de produtividade (CGEE 2017) (Figura 1).

Figura 1 Estimativa da produtividade de Etanol no Brasil. Cenários adotados para a produção de E2G são apresentados para dois períodos: 2015-2020 e 2021-2025.



Adaptado de CGEE 2017.

Assumindo um contexto apropriado, a produção total de E2G o Brasil poderá atingir 3,25 milhões de m³ em 2020 e 10 milhões de m³ até 2025. Neste cenário, as plantas industriais para produção de E2G poderiam ser integradas as usinas de produção de etanol de E1G, considerando adaptações de moinhos existentes e isoladas. A introdução da “cana energia” como parte da matéria-prima só deve ocorrer no segundo período (2021-2026). Além do E1G associado nas unidades E2G, algumas novas produções da E1G também são consideradas (Figura 1).

Por conta das perspectivas favoráveis, o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e a Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) alcançaram, em 2011, o PAISS. O PAISS é um plano governamental para apoiar a inovação nos setores açúcar/energia e açúcar/química. O plano está em sua segunda fase e já foram observados resultados positivos, como mostra a implementação de duas plantas em escala comercial e uma planta demonstrativa de E2G no Brasil. A capacidade instalada poderá produzir cerca de 140 milhões de litros de bioetanol por ano. O Brasil conseguiu permanecer na fronteira tecnológica da bioenergia, com esforços comparáveis aos observados nos Estados Unidos, Europa (UE) e na China, cuja capacidade instalada é, respectivamente, 305, 80 e 65 milhões de litros de bioetanol por ano. Os primeiros números sobre a produção e comercialização da E2G pelas empresas brasileiras têm estimulado investimentos significativos: uma empresa brasileira (Raizen) apresentou seus planos de investir aproximadamente US\$ 1,5 bilhão para implantar oito usinas de E2G até 2024, com capacidade total de 1 bilhão de litros de bioetanol por ano (CGEE, 2017).

3.3. A biomassa vegetal e os principais resíduos lignocelulósicos

A biomassa vegetal produzida pela fotossíntese é o recurso orgânico renovável mais abundante na Terra. Estima-se que a produção de lignocelulose mundial por ano seja da ordem de $1,3 \times 10^{10}$ toneladas métricas. A lignocelulose desempenha função vital como componente estrutural de espécies vegetais, mais precisamente na sustentação de suas paredes celulares, contribuindo ainda com a manutenção da estabilidade hidrolítica e na resistência à ataques de micro-organismos. Esse biopolímero pode ser proveniente de espécies lenhosas, herbáceas, gramíneas, plantas aquáticas e algas, bem como de resíduos de diversas naturezas tal como industrial, agrícola, florestal, animal, biossólidos e sólidos municipais (ALVIRA et al., 2010; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; DEMIRBAS, 2011; LEE; HAMID; ZAIN, 2014; PÉREZ et al., 2002).

O volume de resíduos lignocelulósicos de diversas origens, tais como silvicultura, agricultura, indústria e urbano, tem aumentado em todo o mundo. O acúmulo desse material está diretamente relacionado ao permanente crescimento demográfico e do setor agroindustrial, sendo que sua disposição final consiste em uma preocupação ambiental. Embora resíduos de biomassas vegetais estejam atrelados à poluição, sua disponibilidade e composição permitem que sejam utilizados para obtenção de uma variedade de produtos de valor comercial, como por exemplo papel, ácidos orgânicos e biocombustível. Deste modo, os resíduos agroindustriais podem assumir a posição de recursos renováveis à medida que são convertidos em produtos com valor agregado e disponibilidade no mercado (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; MADHAVAN et al., 2009; SÁNCHEZ, 2009; SILVA; GOMES; ALSINA, 2007).

Os resíduos lignocelulósicos também podem ser obtidos a custos negativos. Fontes geradoras de resíduos têm despesas com sua destinação final e, em alguns casos, podem recompensar financeiramente a coleta do material. Esse processo faz com que o investimento para a aquisição de resíduos lignocelulósicos seja bastante atrativo (DEMIRBAS, 2011).

Para o aproveitamento eficaz do material, é importante conhecer a composição química da lignocelulose para então decompô-la em unidades que serão convertidas em produtos de valor comercial. Portanto, o processo de fracionamento da lignocelulose, a fim de obter intermediários reativos tais como celulose, hemicelulose e lignina, é considerado crucial para alcançar o produto final (LEE; HAMID; ZAIN, 2014).

3.3.1. O bagaço de cana-de-açúcar como um potencial energético

O bagaço de cana-de-açúcar é um material fibroso classificado como um resíduo do processo de moagem da cana-de-açúcar para obtenção de seu caldo, que é posteriormente convertido em produtos como açúcar e etanol. No Brasil, esse subproduto da indústria canavieira é o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade. Na safra de 2011/2012, cerca de 163 milhões de toneladas de bagaço foram produzidas no Brasil, correspondendo a aproximadamente 30% do total de cana-de-açúcar colhida (CONAB, 2013; DEMIRBAS, 2011; SILVA; GOMES; ALSINA, 2007). Estima-se que a produção mundial de bagaço de cana-de-açúcar seja da ordem de 580 milhões de toneladas por ano, com um rendimento anual de 22,9 toneladas por hectare (HOANG et al., 2015).

Parte do bagaço produzido é utilizado para a cogeração de energia elétrica e para abastecimento da própria usina onde é produzida (CONAB, 2011, 2016). Nas usinas sucroalcooleiras, o bagaço também é direcionado para o aquecimento das caldeiras das instalações. Ainda assim, normalmente há um excedente de bagaço que é eliminado por queima ineficiente (DEMIRBAS, 2011).

Estudos apontam para a possibilidade de utilizar o excedente de bagaço para promover a valorização da biomassa residual da cana-de-açúcar e para obter ração animal e nanoestruturas em indústrias químicas. Além disso, o bagaço excedente é utilizado por papeleiras (como adsorvente de contaminantes orgânicos), como substrato para produção de enzimas, bioprodutos de alto valor e componentes materiais da construção civil (NIGAM; SINGH, 2011; SÁNCHEZ, 2009; SILVA; GOMES; ALSINA, 2007; XUE et al., 2016).

3.4. Composição estrutural da biomassa vegetal

Durante a evolução, a parede celular que compõe os vegetais atingiu níveis extremamente complexos, tanto na composição dos polissacarídeos, quanto em suas interações. Tais relações entre polissacarídeos formam emaranhados de fibras que protegem a celulose contra a ação de micro-organismos e enzimas (CHUNDAWAT et al., 2011; PAULY; KEEGSTRA, 2008). Outras funções da parede celular das plantas está em proporcionar a resistência mecânica do tecido, formando condutores por onde podem deslocar água e substâncias por toda a planta (CARPITA; MACCAN, 2000).

A parede celular vegetal é constituída, em sua maioria, por celulose, hemicelulose e lignina, formando uma complexa estrutura cristalina, recalcitrante e insolúvel. Na parede celular, encontra-se, em menores quantidades, pectina, proteínas, amido, ácidos graxos resinas, sais minerais e taninos, que contribuem para a heterogeneidade dos materiais

lignocelulósicos (MAITY, 2015; NANDA et al., 2014; BON; FERRARA, CORVO, 2008; BUCKERIDGE et al., 2008).

3.4.1 Celulose

A celulose é a principal fonte de carbono renovável na natureza sendo o componente principal da matéria vegetal. Esse polímero é constituído por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ formando cadeias lineares não-ramificadas de 1,4- β -D-glicana. As moléculas de celulose são alinhadas em pequenos grupos através de ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals*. Tais agrupamentos possuem diferentes tamanhos e comprimentos e formam fibrilas insolúveis em água que conferem elevada resistência à sacarificação (CARVALHO et al., 2009; CHUNDAWAT et al., 2011; RAMOS, 2003).

3.4.2. Hemicelulose

A hemicelulose é a segunda fonte de carbono mais abundante na parede celular e representa cerca de 20 a 40% dos constituintes da matéria vegetal. Este polímero conecta a lignina às fibras de celulose e é responsável pela rigidez da biomassa. A sua composição contém heteropolissacarídeos formados por estruturas ramificadas e lineares constituídas por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), grupamentos acetila e ácidos urônicos (ácido 4-Ometilglucurônico, ácido glucurônico e ácido galacturônico) (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; HOWARD et al., 2003). Assim, os polímeros recebem uma classificação dependendo do açúcar que constitui a hemicelulose, como, por exemplo, as glucanas (β -D-glicose) e xilanas (resíduos de β -D-xilose). A hemicelulose de cana-de-açúcar é constituída principalmente por um tipo específico de xilana, denominado de glicoarabinoxilana (GAX) e, em segundo lugar por 1,3-1,4- β -D-glucana (BG) e em menores quantidades de xilanas, xiloglicanas (XG) e glicomananas (GM) (PAULY; KEEGSTRA, 2008; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

3.4.3. Lignina

A lignina é encontrada na parede celular vegetal, principalmente na parede secundária, onde possui funções de suporte estrutural, impermeabilidade à água, mecanismo de defesa contra patógenos e stress oxidativo (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A lignina é um heteropolímero, amorfo, complexo, não sacarídico, com massa molecular elevada e com a

presença de várias ligações do tipo carbono-carbono e aril-éter. A lignina é composta por três diferentes unidades de fenilpropano: os alcoóis coniferílico, p-cumarílico e sinapílico. A lignina dificulta o acesso à celulose e à ação das enzimas, além de adsorver as enzimas hidrolíticas. Em adição, com a degradação da lignina, compostos fenólicos são liberados e levam à inibição de proteínas acessórias e hidrolases de glicosídeos (GHs) (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; LIMAYEM; RICKE, 2012; MAITY, 2015).

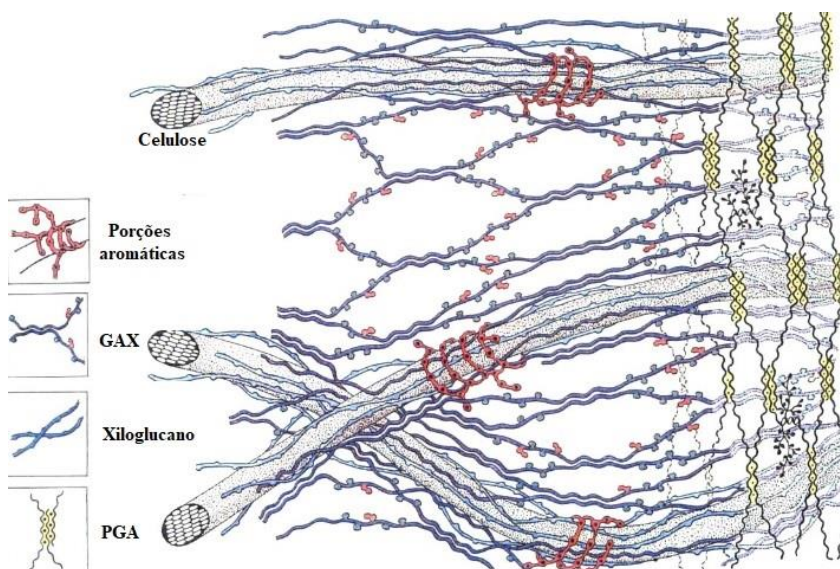
3.4.4. Pectina

A pectina é considerada a mais complexa família de polissacarídeos. Esse polissacarídeo está presente na parede primária dos materiais lignocelulósicos, assim como nas células em crescimento. A pectina tem um papel estrutural ao atuar na flexibilidade nas plantas. Além disso, esse heteropolissacarídeo é composto principalmente por ácido galacturônico (ramnogalacturano tipo I e tipo II, homogalacturano e xilogalacturano), além de grupos carboxílicos esterificados com metanol (CAFFALL; MOHNEN, 2009; MOHNEN, 2008; YADAV et al., 2009).

3.4.5. Tipos de parede celular

Dois tipos de parede celular são encontrados nas células vegetais: a parede primária e a parede secundária. Na fase de crescimento celular, é formada a parede primária, que pode ser classificada em tipo I e tipo II conforme a composição de polissacarídeos. A parede celular primária do tipo I encontrada em monocotiledôneas e dicotiledôneas não-commelinales, onde o principal constituinte da hemicelulose é o xiloglucano, além de polissacarídeos pécticos em grandes quantidades. A parede celular primária do tipo II é presente em monocotiledôneas commelinales, como a ordem *Poales*, onde a cana-de-açúcar se encontra, no qual possui o arabinoxilano e o β -glucano entre os principais constituintes da hemicelulose, com baixa quantidade de xiloglucano. Além disso, é relatada a alta quantidade de celulose e pouca quantidade de polímeros de pectina, como representado (Figura 2) (CARPITA, 1996; CARPITA; GIBEAUT, 1993; DE SOUZA et al., 2013; HSIEH; HARRIS, 2009).

Figura 2. Parede celular primária do tipo II encontradas em gramíneas, como a cana-de-açúcar. Esta é composta por celulose, hemicelulose (GAX, β -D-glucano e xiloglucano), lignina (porções aromáticas) e pectina (ácido poligalacturônico PGAs e ramnose).



Adaptado de Carpita; Gibeaut, (1993).

A parede celular secundária é depositada na fase em que o alongamento celular não ocorre mais. A parede secundária geralmente contém várias camadas, sendo mais espessa que a parede primária. A hemicelulose da parede celular secundária é composta principalmente por mananas e/ou arabinoxilano. Neste tipo de parede, a lignina é encontrada substituindo a água, e o que dificulta o acesso das enzimas hidrolíticas (PAULY; KEEGSTRA, 2008).

Conforme a espécie vegetal, o tipo da parede celular, a idade da planta, a parte analisada, e as condições de crescimento, a sua composição pode variar (CARVALHO et al., 2009; DE SOUZA et al., 2013; SZCZERBOWSKI et al., 2014). Em relação a biomassa proveniente da cana-de-açúcar, a composição aproximadamente (m/m) está em torno de 32-55% de celulose, 27-32% de hemicelulose e 19-25% de lignina, o que representa cerca de 90% da composição da parede (SÁNCHEZ, 2009; SILVA; GOMES; ALSINA, 2007).

Em gramíneas, a pectina compõe em torno de 10% da parede celular. Outros componentes são encontrados em menor porcentagem, como os extrativos (6-7,5%), minerais silicatados (1-4%), além de ceras, carboidratos e compostos aromáticos (DE SOUZA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2009; MASARIN et al., 2011; PAULY; KEEGSTRA, 2008; REZENDE et al., 2011).

3.5. O pré-tratamento da biomassa

De modo geral, o pré-tratamento da biomassa tem como objetivo provocar alterações estruturais na lignocelulose, e sobretudo romper a estrutura da lignina, remover parte da hemicelulose e reduzir a cristalinidade da celulose. Neste processo, ocorre diminuição da parede celular, facilitando o acesso das enzimas à celulose e também ao remanescente de hemicelulose, durante a etapa de hidrólise. A hidrólise da biomassas, sem pré-tratamento prévio, ainda é lenta e apresenta baixo rendimento (ALVIRA et al., 2010; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; SOCCOL et al., 2010; VISSER et al., 2015).

Sob uma perspectiva operacional, considera-se que o pré-tratamento prepara a biomassa para a sacarificação ao aumentar digestibilidade da celulose em relação a configuração íntegra da lignocelulose. Sabe-se que o tipo de pré-tratamento afeta os resultados das etapas subsequentes e, portanto, representa um passo essencial para o sucesso da obtenção de açúcares que serão convertidos em etanol (ALVIRA et al., 2010; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009b; SHAHEEN et al., 2013). O pré-tratamento pode ser de natureza física (fragmentação mecânica e extrusão), química (alcalinos, ácido, ozólise, organosolve e líquidos iônicos), físico-química (explosão à vapor, hidrotérmico, *Ammonia Fiber Explosion* - AFEX, oxidação úmida, microondas, ultrassom, e CO₂ supercrítico) e biológica (enzimas de micro-organismos) (ALVIRA et al., 2010; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; SOCCOL et al., 2010).

A seleção do pré-tratamento é um dos fatores decisivos para tornar a sacarificação eficaz e economicamente viável. Uma vez que, a etapa de sacarificação é dependente do tipo de biomassa utilizado, os entraves ligados ao pré-tratamento como: a composição da biomassa resultante, a geração de compostos tóxicos e, a demanda de energia em processos à jusante, a recuperação de pentoses, e a quantidade de água utilizada são decisivos para a viabilidade do processo de obtenção do etanol (ALVIRA et al., 2010).

Geralmente, o pré-tratamento produz compostos tóxicos que inibem a hidrólise e a fermentação. Esses produtos da degradação da lignocelulose são ácidos carboxílicos, derivados de furano e compostos fenólicos. A concentração dessas substâncias varia de acordo com o processo adotado (ALVIRA et al., 2010; NIGAM; SINGH, 2011; VISSER et al., 2015).

O pré-tratamento biológico é apontado como um possível substituto para os métodos convencionais físico-químicos. Essa alternativa é vantajosa, pois opera em condições brandas de reação, reduzir reações secundárias, compostos inibidores de fermentação e resíduos, além de apresentar menor consumo de energia. Embora o processo biológico de pré-tratamento seja

ambientalmente vantajoso, ele é também bastante dispendioso, de modo a limitar a sua aplicação (PÉREZ et al., 2002).

No pré-tratamento biológico, enzimas de micro-organismos desempenham a deslignificação e remoção de hemicelulose do material. Micro-organismos lignocelulolíticos, como bactérias do gênero *Streptomyces* e fungos basidiomicetos de podridão branca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Paralepetopsis floridensis*, *Daedalea flavida* e *Ceriporiopsis subvermispora*) são eficazes na degradação de lignina por meio da ação de peroxidases e lacases. Fungos de podridão marrom estão mais associados à degradação de hemicelulose. No entanto, ainda são necessários estudos que visam melhorar os rendimentos e o custo do processo (ALVIRA et al., 2010; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; PÉREZ et al., 2002; VISSER et al., 2015).

3.6. Processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica e fermentação

Uma vez pré-tratada, a biomassa lignocelulósica é submetida à sacarificação utilizando um conjunto de enzimas contidas em coquetéis enzimáticos que agem em sinergismo em condições específicas. A sacarificação consiste na desconstrução dos polímeros de celulose e hemicelulose provenientes do processo de pré-tratamento, a fim de obter açúcares passíveis de serem fermentados na etapa subsequente.

A operação visa obter açúcares monoméricos solúveis, hexoses e pentoses por meio da conversão de celulose em glicose e hemicelulose em xilose (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; VISSER et al., 2015).

3.6.1. Desconstrução dos polímeros da parede celular

As enzimas que atuam na desconstrução da biomassa têm sido classificadas em famílias. Essa classificação se baseia na sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, afinidade ao substrato e homologia estrutural (SCHNEIDER et al., 2016; SWEENEY; XU, 2012; YEOMAN et al., 2010). Para essa classificação, um banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*) foi criado e se encontra acessível pelo link <http://www.cazy.org/>. As enzimas que modificam ou degradam polissacarídeos estão organizadas na plataforma CAZy como hidrolases glicosídicas (GHs), que realizam a hidrólise e/ou rearranjo de ligações glicosídicas; carboidrato esterases (CEs), que hidrolisam ésteres de carboidratos; transferases glicosídicas (GTs), que catalizam a formação de ligações glicosídicas; polissacarídeo liases (PLs), que clivam de maneira não-hidrolítica as ligações glicosídicas; atividades auxiliares (AAs), que possuem atividade redox e agem em conjunto

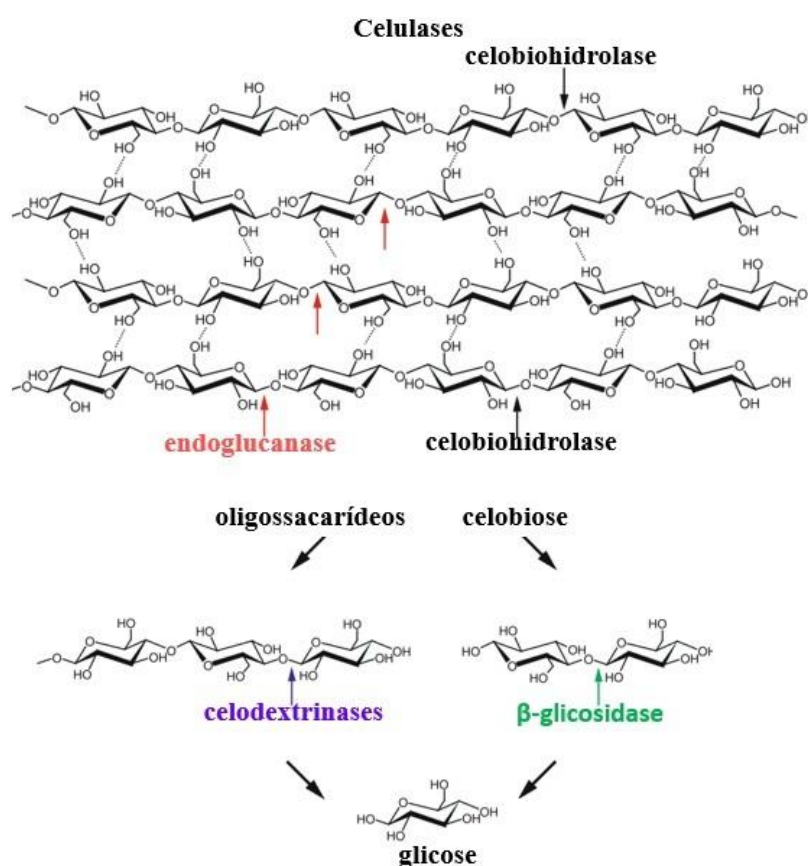
com outras enzimas CAZy; além dos módulos de ligação ao carboidrato (CBMs), considerados proteínas que proporcionam a adesão da enzima ao carboidrato.

As enzimas que catalisam a despolimerização da celulose são classificadas como celulasas (Figura 3). No entanto, a hidrólise completa e eficiente da celulose requer a ação cooperativa de pelo menos três atividades enzimáticas celulolíticas, nomeadas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. Essas enzimas hidrolisam ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ entre resíduos de β -D-glicose.

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivam a celulose nas regiões amorfas de modo aleatório, criando novas extremidades de cadeia, diminuindo o grau de polimerização. As exoglucanases, conhecidas como celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), atuam nas extremidades redutoras (celobiohidrolase II) e nas extremidades não redutoras (celobiohidrolase I) produzindo o dissacarídeo celobiose, celo-oligossacarídeos e, em alguns casos, glicose.

Por fim, as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose e celodextrinas solúveis em glicose (MOREIRA; MILANEZI; FERREIRA FILHO, 2011). Na oxidação das ligações $\beta(1\rightarrow4)$ da celulose, principalmente da forma cristalina, uma classe de enzimas auxiliares (monooxigenases líticas de polissacarídeos - LPMOs) produzem radicais livres em seu sítio ativo (MORGENSTERN *et al.*, 2014).

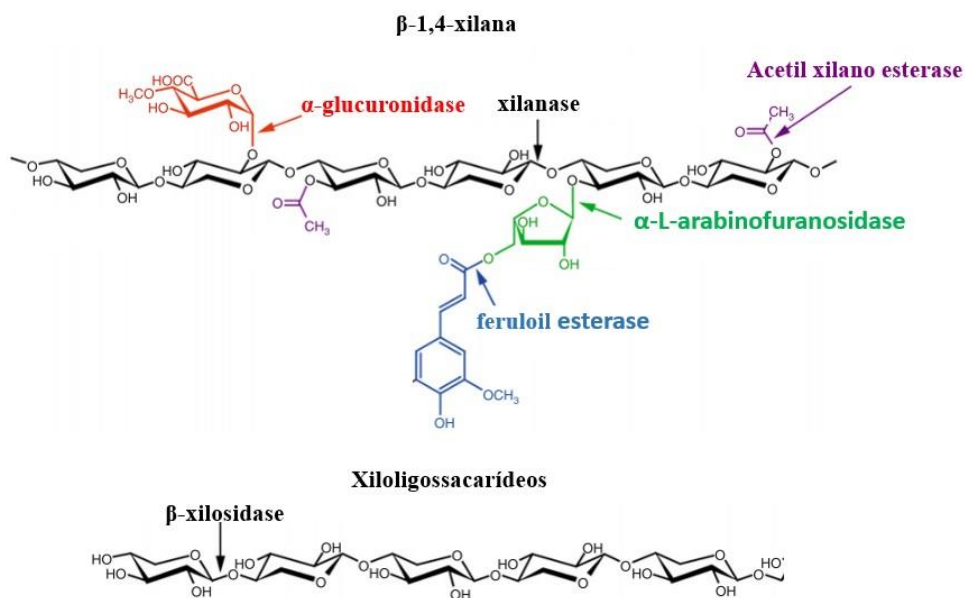
Figura 3. Componentes da celulose e as enzimas envolvidas em sua desconstrução.



Fonte: Adaptado de Yeoman et al. (2010)

Em razão da natureza heteropolissacarídica e a diversidade de resíduos nas cadeias laterais das hemiceluloses, a sua conversão total necessita de enzimas com diferentes especificidades (Figura 4). As enzimas que agem sobre o polímero de glicoarabinosilana (GAX) são: endo-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam as ligações (β -1,4) internas do esqueleto de heterosilana e levam a diminuição do grau de polimerização do substrato; α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), que remove os resíduos de L-arabinose substituídos nas posições 2 e 3 das unidades de xilose; α -glucuronidas (EC 3.2.1.139), que hidrolisam as ligações α -1,2 do glucuronosilana entre os resíduos de ácido glucurônico e unidades de xilose; acetil-xilano esterases (EC 3.1.1.72), que removem grupos O-acetil a partir das posições 2 e 3 dos resíduos de xilose na acetil-xilana; feruloil esterases (EC 3.1.1.73) e o ácido p-cumárico esterase (EC 3.1.1.-), que clivam as ligações éster entre arabinose e ácido ferrúlico ou ácido p-cumárico, respectivamente.

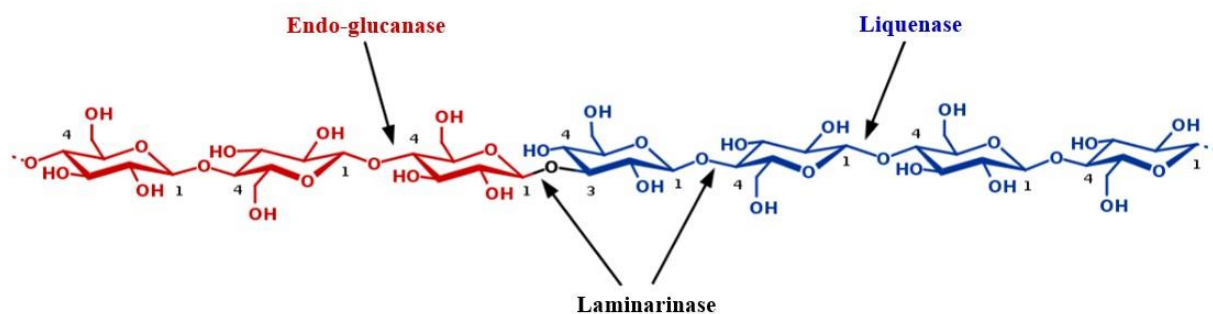
Figura 4. Componentes da glicoarabinoxilana (GAX) e as enzimas envolvidas na sua desconstrução.



Fonte: Adaptado de Yeoman et al. (2010).

As enzimas que degradam BG (Figura 5) são as endo-glucanases (EC 3.2.1.4), laminarinase (EC 3.2.1.6) e liquenase (EC 3.2.1.73). Na hidrólise da xiloglicanas (XG), as enzimas atuantes são as xiloglucanases (EC 3.2.1.151), e na degradação de glicomananas (GM), as β-mananases (EC 3.2.1.78). Os xilooligosacarídeos, e a xilobiose são hidrolisados pelas β-xilosidases (EC 3.2.1.37) pelas extremidades não redutoras (MOREIRA; MILANEZI; FERREIRA FILHO, 2011; YEOMAN et al., 2010)

Figura 5. Componentes da β-1,3-1,4 glucana(BG) e as enzimas envolvidas na desconstrução.



Fonte: Adaptado de Yeoman et al. (2010).

Para a degradação da estrutura altamente complexa da lignina, as enzimas necessárias são as redutoras e as produtoras de H_2O_2 que atuam em conjunto. Assim, a lignina peroxidases (EC 1.11.1.14), lacases (EC 1.10.3.2), e manganês peroxidases (EC 1.11.1.13) são envolvidas na desconstrução da lignina (POLAINA; MACCABE, 2007; HOWARD et al., 2003).

Para a desconstrução da pectina devido a sua composição complexa, são requeridas diferentes pectinases como as poligalacturonase (PG), pectinesterase (PE), pectinaliase (PL) e pectatoliase (PAL) (MARTOS et al., 2013). A ligação cruzada da celulose e hemicelulose com lignina (ligação éster-éter) é apontada como um fator que confere recalcitrância ao material. Isto é, resistência a degradação. Além desse fator, outros contribuem para a recalcitrância, sobretudo o alto teor de lignina, a alta cristalinidade/polimerização da celulose, seu revestimento por hemicelulose e lignina, sua baixa área superficial de acessibilidade e a forte resistência de sua fibra. Neste sentido, a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos assume posição de importância na elaboração do processo de obtenção de produtos, uma vez que a resistência de degradação limita a obtenção de intermediários reativos (LEE; HAMID; ZAIN, 2014).

Assim, a sacarificação eficiente da biomassa requer coquetéis enzimáticos completos, envolvendo diferentes classes de enzimas (celulases, hemicelulases e enzimas acessórias, como arabinases, glucanases, liases, pectinases e vários tipos de esterases), em quantidades equilibradas e otimizadas. Além disso, os rendimentos de hidrólise podem ser afetados pela recalcitrância da biomassa e a eficiência do pré-tratamento (BERLIN et al., 2007; BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015).

Alguns micro-organismos, sobretudo diferentes espécies de fungos, apresentam capacidade de produzir extracelularmente grandes quantidades de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Portanto, despertam interesse para produzirem enzimas aplicadas à sacarificação da biomassa em grande escala (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; VISSER et al., 2015). Além dos fungos, os gêneros bacterianos *Streptomyces*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Cellulomonas* são explorados para a obtenção de enzimas ativas em carboidratos (CAZymes). O gênero *Streptomyces* se destaca consideravelmente por possuir características requeridas em bioprocessos em nível industrial (HAMANN et al., 2015; HECK; HERTZ; AYUB, 2002; JANG; CHEN, 2003; KIDDINAMOORTHY et al., 2008; SHABEB et al., 2010).

Após a sacarificação enzimática da fração de celulose e hemicelulose com a formação dos açúcares fermentescíveis (hexoses e pentoses), ocorre o processo de fermentação alcoólica. A fermentação utilizando glicose pode ser realizada por leveduras do gênero

Saccharomyces cerevisiae, que metabolizam esse açúcar em condições de anaerobiose produzindo o etanol, além de outros subprodutos. Por conseguinte, a fermentação de pentose é realizada por organismos como as leveduras *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae*, *Spataspora passalidarum*, *Candida guilliermondii* e *Phachysolen tannophilus* (MINIC; JOUANIN, 2006; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000b; SÁNCHEZ, 2009; SOCCOL et al., 2010).

3.6.2. Entraves encontrados no processo de sacarificação

O processo de sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica requer o desenvolvimento de tecnologias para o alcance de custos de produção menores e com maior eficiência, para que o produto final possa ser competitivo no mercado (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; SHAHEEN et al., 2013).

O elevado custo das enzimas é o principal responsável por onerar a hidrólise enzimática. Esse valor pode corresponder a até 50% dos gastos do processo total de produção do combustível. A determinação das condições de sacarificação mais adequadas, tais como as enzimas utilizadas e a sua quantidade, é intimamente relacionada ao pré-tratamento aplicado à biomassa e às características do material pré-tratado que sofrerá sacarificação (ALVIRA et al., 2010; SHAHEEN et al., 2013; VISSER et al., 2015). Além disso, estudos apontam para a relevância de novos coquetéis enzimáticos que buscam combinações enzimáticas eficientes podem tornar o processo de sacarificação mais eficaz (ALVIRA et al., 2010; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009).

Embora a alta complexidade de uma cultura de múltiplos micro-organismos compatíveis possa ser uma desvantagem em termos de processos industriais controlados, essa condição mimetiza a degradação de lignocelulose na natureza. Como nenhuma cepa de fungo, mesmo mutante ou modificada, produz concomitantemente todas as enzimas necessárias em quantidade suficiente para a sacarificação completa de biomassas vegetais, faz-se necessária a adição de enzimas deficientes aos coquetéis enzimáticos. Esse processo pode ser realizado através da combinação de extratos enzimáticos de diferentes organismos e pela suplementação de coquetéis enzimáticos com enzimas recombinantes eficientes e em doses adequadas (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; DUTRA et al., 2017; VISSER et al., 2015). Em adição, para o aprimoramento do processo de sacarificação, outras perspectivas também têm sido consideradas como a engenharia metabólica, que visa bloquear vias indesejáveis e intensificar as de interesse, expressão heteróloga de proteínas, que visa o aumento da produtividade e atividade enzimática, bem como o desenvolvimento de proteínas quiméricas

multifuncionais e mutantes eficientes (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; VISSER et al., 2015).

3.7. A sacarificação da biomassa com coquetéis enzimáticos termofílicos

Para maioria das tecnologias existentes, a sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos ocorre a temperaturas de 50 °C. Vários problemas são relatados nesse tipo de sacarificações como a lenta conversão dos materiais lignocelulósicos em açúcar, baixas taxas de rendimentos, sacarificação incompleta, altas doses de enzimas e propensões a contaminações com micro-organismos do ambiente (VIAKARI et al., 2007; YEOMAN et al., 2010).

A sacarificação em temperaturas mais elevadas com coquetéis termoestáveis são descritas por oferecerem vantagens em relação aos coquetés mesofílicos. As vantagens mais importantes relatadas são: aumento da produtividade resultando em reações mais rápidas, menor risco de contaminação com organismos mesofílicos, recuperação facilitada de etanol, redução de custos de energia para o resfriamento após pré-tratamento térmico, solubilidade aumentada de substrato - que confere maior fluidez do meio com operações em maiores concentrações de material lignocelulósico, redução da quantidade de enzima necessária, atuação em amplas faixas de pH e maior resistência à agentes detergentes e à enzimas proteolíticas (GOMES et al., 2007; TAYLOR et al., 2009; VIAKARI et al., 2007; ZHANG et al., 2011a).

Os micro-organismos produtores de celulasas e xilanases termofílicas são considerados os mais eficientes decompositores da biomassa vegetal (LIANG et al., 2011;; MAKI; LEUNG; QIN, 2009; SHRINIVAS et al., 2010). Os fungos termófilos destacam-se por produzir enzimas termotolerantes e termoestáveis dotadas de propriedades atrativas e proveitosas para bioprocessos industriais (HU et al., 2012 BALA; SINGH et al., 2019).

3.8. Fungos filamentosos termófilos

Fungos são classificados como termófilos ou termotolerantes dependendo da temperatura em que ocorre seu crescimento. Fungos termotolerantes são capazes de se desenvolver até a temperatura máxima de 50 °C, com uma temperatura mínima de crescimento abaixo de 20 °C. Termófilos são aqueles que possuem a temperatura de crescimento de 50 °C ou acima, com a temperatura mínima de crescimento igual a 20 °C ou acima (AIKAWA et al., 1990; BLÖCHL et al., 1997 COONEY; EMERSON, 1964).

No entanto, ao considerar essa definição, muitos fungos termotolerantes são classificados como termófilos. Por exemplo, *Aspergillus fumigatus* pode crescer entre 12 °C até 57 °C (MOUCHACCA, 2000a).. A definição mais utilizada pela micologia aplicada e industrialmente é a proposta por Maheshwari et al. (2000), no qual descreve que os fungos termófilos apresentam temperatura ótima de crescimento de 45 °C ou mais. No entanto, ainda há controvérsias sobre esse sistema. Contudo, uma possibilidade menos divergente para a classificação de fungos termofílicos e termotolerantes é adotar um intervalo de crescimento ótimo entre 40 a 50 °C, sendo termófilos os organismos com a incapacidade de crescimento de abaixo de 20 °C e termotolerantes com a capacidade de crescimento abaixo de 20 °C (MOUCHACCA, 2000b, 2000a).

Os fungos termofílicos constituem um grupo heterogêneo de vários gêneros, como os Ascomycotas, Phycomycetes, Fungos imperfeitos e *Mycelia sterilia*. Esses micro-organismos são de natureza ubíqua e são isolados de ambientes com materiais orgânicos em decomposição em condições termogênicas. Portanto, esses micro-organismos são os principais componentes da microflora que se desenvolve em amontoados de massa vegetal, acúmulo de matéria orgânica, pilhas de produtos agrícolas e produtos florestais e solos. Esses ambientes quentes, úmidos e aeróbios proporcionam condições básicas para o desenvolvimento desses organismos (MAHESHWARI et al., 2000 JOHRI et al.,1999).

O isolamento de vários fungos termofílicos é realizado em diferentes substratos através de técnicas de enriquecimento adequadas e modificações nutricionais. No entanto, ambientes não termogênicos, como o carvão, solos úmidos, solos antárticos e sub-antárticos, sedimentos aquáticos, onde a temperatura do fundo nunca excede 6-7 °C também abrigam cepas de fungos termofílicos (JOHRI et al.,1999).

3.8.1. Adaptações à termofilia

Adaptações singulares únicas contribuem para a sobrevivência e crescimento de fungos termófilos em temperaturas elevadas. As membranas celulares desses organismos possuem ácidos graxos insaturados em substituição com ácidos graxos saturados. Essa estrutura promove o equilíbrio entre densidade e fluidez, que contribui para a integridade funcional da membrana a temperaturas elevadas (ADAMS, 1993).

Os genes responsáveis pela melanização das hifas são encontrados em fungos termófilos, conferindo à característica de resistência a radiação UV e dessecação a temperaturas elevadas. Outra peculiaridade está no genoma desses organismos que é reduzido em comparação com organismos mesófilos (VAN NOORT et al., 2013).

As proteínas extracelulares expressas para atuarem em ambientes termófilos, que sobrevivem esses organismos, apresentam de uma forma geral estabilidade cinética, térmica e dinâmica. As diferenças encontradas nas proteínas termofílicas podem ser observadas nas sequências que as codificam, estruturas, função dinâmica e propriedade termodinâmica quando comparado com proteínas de organismos mesófilos (NIEHAUS et al., 1999). As enzimas termoestáveis são adequadas para processos industriais aplicáveis, pois a maioria desses processos ocorrem em temperaturas elevadas. As inovações no desenvolvimento de enzimas termoestáveis são aspectos importante da biotecnologia, para reduzir as limitações quanto a termolerância e termoestabilidade, entre outras características. Para isso técnicas de manipulação genética, combinação com recombinantes projetados, mutagênese dirigida e tecnologias de evolução enzimática têm sido exploradas (GOLDSMITH; TAWFIK, 2012; ZHANG et al., 2011a).

3.8.2. Aplicações biotecnológicas de enzimas de fungos termofílicos

Nas últimas décadas, proteínas de fungos termofílicos têm sido alvo na engenharia genética, melhoramento de produção e em aplicações comerciais (BALA; SINGH, 2019; BERKA et al., 2011). As proteínas produzidas por estes organismos são relatadas em diversos processos, como nas indústrias farmacêutica, alimentícia, têxtil, química, papelreira, biocombustíveis e outras (JOHRI et al., 1999).

Na sacarificação de biomassas, as enzimas utilizadas são majoritariamente derivadas do gênero *Trichoderma*. Esses organismos vivem em temperaturas mesofílicas (entre 45 e 50 °C) e a pH 5.0. Contudo, a sacarificação nessas condições, quando comparada a de coquetéis termofílicos, apresenta desvantagem significativas. Enzimas termoestáveis oferecem várias vantagens em relações as enzimas mesofílicas para aplicações de biotecnologia (JOHRI et al., 1999; FERNANDES; MURRY; TUOHY, 2008; MCCLENDON et al., 2012; PERKINS et al., 2015).

Desse modo, as enzimas secretadas de fungos termófilos desempenha um papel importante na sacarificação de biomassas vegetais, representando uma fonte eficiente de enzimas a serem exploradas na conversão de material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis e consequentemente produção de biocombustível (HAKI; RAKSHIT, 2003; MAKI; LEUNG; QIN, 2009; MCCLENDON et al., 2012; SOUZA, 2010; YEOMAN et al., 2010).

Ao estudarem as cepas termofílicas *Myceliophthora thermophila* e *Myceliophthora heterothallica*, Moretti et al. 2012 e Van Den Brink et al. (2013) descreveram estas espécies como potenciais bioconversores de resíduos lignocelulósicos em açúcares. Os autores observaram o potencial dessas cepas selvagens na aplicação em escala industrial da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar e na posterior produção de bioetanol de segunda geração.

O potencial dos fungos termofílicos se tornaram ainda mais evidentes após a caracterização do genoma de *Chaetomium thermophilum*, *Thielavia terrestres*, *Thielavia heterothallica* e *Myceliophthora thermophila*. Essas espécies termofílicas são fontes de enzimas e são capazes de sacarificar, com altos rendimentos, todos os principais polissacarídeos presentes na biomassa. A cepa C-1 de *M. thermophila* foi desenvolvida para a produção comercial de celulasas em larga escala. O coquetel enzimático dessa espécie produz altas taxas de sacarificação e conversão a temperaturas mais altas (60 °C) (BERKA et al., 2011; HANS et al., 2011; HARRIS et al., 2010).

A classificação do gênero *Rasamsonia* foi reorganizado recentemente e inclui apenas representantes termofílicos e termotolerantes. As espécies desse gênero possuem temperaturas ótimas de crescimento acima de 30 °C e temperaturas máximas de crescimento acima de 45 °C. Dez espécies são descritas atualmente para este gênero: *R. composticola*, *R. cylindrospora* (syn. *Geosmithia cylindrospora*), *R. aegroticola*, *R. argillacea* (syn. *Geosmithia argillacea*), *R. brevistipitata*, *R. byssochlamydoides* (syn. *Talaromyces byssochlamydoides*), *R. emersonii* (syn. *Talaromyces emersonii*), *R. Piperina* e *R. pulvericola* (HOUBRAKEN et al., 2013; HOUBRAKEN; SPIERENBURG; FRISVAD, 2012; SU; CAI, 2012).

As potenciais aplicações para as enzimas termoestáveis derivadas desse gênero são da espécie *Rasamsonia emersonii* (syn *Talaromices emersonii*), incluindo processamentos de alimentos, processos de bioconversão e biocombustíveis, sendo considerado um eficiente fungo produtor de celulasas (FERNANDES; MURRY; TUOHY, 2008; WATERS et al., 2010). Esta espécie possui uma cepa que foi selecionada para ser desenvolvida industrialmente, onde enzimas são capazes de sacarificar a biomassa em temperaturas maiores que 50 °C (HOUBRAKEN; SPIERENBURG; FRISVAD, 2012; PERKINS et al., 2015).

Do gênero *Thermoascus*, o fungo termofílico *T. aurantiacus* é a espécie que mais apresenta estudos, sendo a mais bem caracterizada quanto a sua produção de enzima. Esta espécie apresenta temperaturas ótimas de crescimento em torno de 50 °C e a temperatura mínima de 30 °C. Este fungo é amplamente relatado por utilizar biomassa vegetal, resíduos agro-industriais e florestais como fonte de carbono para seu eficiente crescimento e produção

enzimática. A alta abundância de materiais lignocelulósicos, o baixo custo desses resíduos e a boa adaptação do crescimento de *T. aurantiacus* nesses substratos, fazem da produção enzimática por esta espécie uma alternativa atraente e promissora (DA SILVA et al., 2005; KALOGERIS et al., 2003; MILAGRES et al., 2004; SANTOS et al., 2003).

Cepas do termofílico *T. aurantiacus* produzem altos níveis de uma variedade de enzimas de interesse comercial, entre elas amilases, proteases, celulasas, pectinases, xilanases, enzimas acessórias entre outras. Tais enzimas são aplicadas em uma ampla gama de processos industriais devido a sua estabilidade em altas temperaturas e tolerância a desnaturantes (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008; MARTINS et al., 2002a; MERHEB-DINI et al., 2009 OHNO et al., 1998). As hemicelulasas e celulasas em especial de *T. aurantiacus* são amplamente relatadas por sua termoestabilidade. A produção de enzimas termoestáveis, utilizadas para a degradação de materiais lignocelulósicos, é amplamente relatada pela espécie de *T. aurantiacus* sendo descrita como potencial para se tornar uma plataforma comercial de produção industrial (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008; GOMES; GOMES; GOMES, 2000; HIMMEL; RUTH; WYMAN, 1999).

Schuerg et al. (2017a) ao analisar o genoma de *T. aurantiacus*, em conjunto com a revisão das principais enzimas descritas para esta espécie, sugere que o arsenal enzimático termotolerante deste fungo seja base de um novo coquetel enzimático comercial para a produção de açúcares, a partir de biomassas lignocelulósicas. Por fim, De Oliveira; Gomes; Rodrigues, (2015) reforçam e encorajam a busca contínua de fungos termofílicos devido ao grande interesse e potencial que suas enzimas apresentam para os processos biotecnológicos, bem como aplicações na produção de etanol de segunda geração.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Utilizar estratégias biotecnológicas para o melhoramento do arsenal enzimático do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* aplicado na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

-

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Capítulo 1

- Revisão bibliográfica do tema abordado.

4.2.2. Capítulo 2

- Selecionar e identificar potenciais fungos termofílicos produtores de CAZymes atuantes na desconstrução de biomassa lignocelulósica.
- Identificar e analisar comparativamente por proteômica as CAZymes encontradas no secretoma das espécies *Rasamsonia composticola* FMG6, *R. emersonii* COQ e *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 crescidas em fontes de carbono lignocelulósica.

-

4.2.3. Capítulo 3

- Avaliar e comparar a eficiência da sacarificação dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6 do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.
- Combinar coquetéis enzimáticos que se destacaram para a obtenção de melhores rendimentos na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.
- Avaliar, selecionar e caracterizar as atividades enzimáticas das melhores combinações de coquetéis termofílicos, obtidos com misturas de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. emersonii* COQ, *R. composticola* FMG6 e CELLIC® CTec2 (coquetel comercial Novozymes).

4.2.4. Capítulo 4

- A partir dos resultados da secretômica de *T. aurantiacus* CBMAI 756 associados aos dados de genômica, detectar a carência de enzimas-chave importantes para a desconstrução do conteúdo de celulignina (polissacarídeos e lignina) presentes na biomassa do bagaço de cana-de-açúcar.

- Produzir de forma recombinante (hospedeiro bacteriano) e caracterizar a endoglucanase (GH12) de *Streptomyces* sp. e a lacase (CotA) de *Bacillus subtilis*.
- Testar as enzimas recombinantes GH12 e lacase CotA em microensaios de suplementação (adição *ex situ*) do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756.
- Quantificar a liberação de glicose e xilose por HPLC produzida pelo coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com enzimas recombinantes após a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, visando o aumento de rendimento da produção de açúcares fermentescíveis

4.2.5. Capítulo 5

- A partir dos resultados da secretômica de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e genômica, detectar a ausência de hemicelulases críticas para a hidrólise mais eficiente da hemicelulose (arabino-xilana) da biomassa do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada.
- Produzir de forma recombinante e caracterizar 6 potenciais endo-xilanases microbianas da família GH11 (GH11ST, GH11 XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12}, XBS^{M6} e XBS^{M6K99E}).
- Avaliar em microensaio a hidrólise e selecionar uma eficiente endo-xilanase GH11 (GH11ST, GH11 XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12}, XBS^{M6} e XBS^{M6K99E}). para suplementar o coquetel enzimático termofílico de *T. aurantiacus* CBMAI 756 defectivo desta enzima, visando o aumento de rendimento da produção de açúcares fermentescíveis do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.
- Suplementar o coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com a melhor GH11 recombinante e quantificar a produção de glicose e xilose por HPLC.

CAPÍTULO 2

Seleção, avaliação e análise secretômica dos arsenais enzimáticos de fungos termófilos com potencial para a sacarificação de biomassas lignocelulósicas.

5.1. RESUMO

Enzimas termoestáveis exibem maior eficiência na sacarificação de biomassas vegetais para a produção de açúcares fermentescíveis. Fungos termofílicos desempenham um papel importante no estudo e aplicação de coquetéis enzimáticos na desconstrução de materiais lignocelulósicos pois produzem uma ampla gama de CAZymes termoestáveis. Neste estudo, foram selecionadas e identificadas novas cepas de fungos termofílicos (*Rasamsonia emersonii* COQ e *Rasamsonia composticola* FMG6), com o potencial para produzir complexos e eficientes coquetéis enzimáticos em resíduos lignocelulósicos por fermentação submersa. O secretoma de cada um destes 3 fungos foi submetido a identificação de seu repertório completo quando produzido em material lignocelulósico complexo (mistura bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo), utilizando a metodologia de espectrometria de massas de proteínas. A maioria das enzimas encontradas no secretoma dos fungos *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ, foram determinadas como ativas em carboidratos (Cazymes), representando 71%, 81% e 69% do total de enzimas detectadas, respectivamente. Uma análise global do secretoma destas três espécies mostraram que são detentoras de um repertório completo de CAZymes. Foram encontradas enzimas atuantes em celulose, hemicelulose, amido, pectina e enzimas com atividades auxiliares. O destaque foi a identificação do arsenal enzimático de *R. composticola*, que não possui relatos na literatura quanto à caracterização e aplicação de seu coquetel. Este estudo destacou que as CAZymes preditas para *R. composticola* podem acessar a mesma diversidade de substratos que os coquetéis de *T. aurantiacus* e *R. emersonii*, considerados como eficientes produtores de enzimas termofílicas e atuantes na desconstrução da biomassa vegetal. Portanto esses arsenais ao serem induzidos por fontes lignocelulósicas produziram importantes enzimas que podem ser estudadas e aplicadas em processos industriais. Além disso, esses resultados foram importantes por ampliar o conhecimento das estratégias utilizadas pelos fungos *T. aurantiacus* e *R. emersonii* assim como *R. composticola* na degradação de materiais lignocelulósicos.

Palavras-chave: Secretoma fungos termofílicos, fermentação submersa, CAZymes, material lignocelulósico, *Thermoascus aurantiacus*, *Rasamsonia*

5.2. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos apresentam uma grande importância ecológica, pois participam da reciclagem natural da biomassa e são responsáveis pela biodegradação lignocelulósica de forma eficiente. Esses possuem capacidade para a produção de enzimas específicas capazes de clivar as cadeias de celulose, hemicelulose e lignina. Dentro da imensa biodiversidade do planeta, há uma busca por novos micro-organismos que possuam enzimas com características adaptativas melhoradas (BORTOLAZZO, 2011; DELABONA, 2011; HARGREAVES; JR, 2008; LYND; WEIMER; PRETORIUS, 2002; ROSA, 2014).

Fungos termófilos são capazes de secretar altos níveis de enzimas comercialmente importantes, com elevada temperatura ótima, ampla tolerância à variação de pH e maior resistência aos agentes desnaturantes. Essas características estimulam vários estudos sobre estes micro-organismos e seus bio-derivados (MORETTI et al., 2012; SALAR; ANEJA, 2007). Assim, os coquetéis enzimáticos termofílicos apresentam muitas vantagens em relação aos coquetéis enzimáticos mesófilicos, os quais atuam em torno de 50 °C, proporcionando assim um aumento de produtividade de açúcares fermentescíveis na bioconversão de carboidratos (VIAKARI et al., 2007; YEOMAN et al., 2010).

Em fungos filamentosos, a produção CAZymes que degradam a biomassa, é estimulada por diversos substratos utilizados como indutores, sendo variados para cada espécie (PULLAN et al., 2014; STRICKER et al., 2008). Substratos complexos, como os materiais lignocelulósicos, quando comparados com açúcares simples (xilose, glicose, dentre outros), podem induzir uma maior produção de enzimas ativas em carboidratos (DELABONA et al., 2012). Outro fator amplamente descrito, que pode influenciar na produção de enzimas em fungos filamentosos, é o processo utilizado de fermentação, pois diferenças metabólicas entre fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm) têm um impacto direto na expressão enzimática do fungo. Ainda há poucos estudos que descrevem a comparação entre estes dois tipos principais de fermentações e a produção de enzimas (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; SUBRAMANIAM; VIMALA, 2012).

FES é definida como um processo em que o crescimento do micro-organismos ocorre em substratos (fonte de carbono) sólidos na ausência ou quase ausência de fluxo de água livre. As vantagens desse processo consistem em obter maior estabilidade e concentração do produto, menor repressão catabólica, cultivo de micro-organismos especificamente em substrato insolúvel, além de uma demanda menor de esterilidade, devido a baixa quantidade

de água utilizada (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

A FSm é um processo de crescimento do micro-organismos em meio líquido. A produção de enzima em FSm é mais estudada e estabelecida, em comparação com a FES. As vantagens desse tipo de fermentação estão no uso industrial, no qual há uma maior facilidade de controle de processo (pH, temperatura, oxigenação e aeração) e esterilização. Além disso, essa produção enzimática pode ser constitutiva ou indutível e apresentar diferentes padrões de expressão, dependendo das condições de cultura (BLANDINO et al., 2002; VIDYALAKSHMI; PARANTHAMAN; INDHUMATHI, 2009).

Este trabalho visa avaliar novas cepas de fungos termofílicos produtoras de celulasas e xilanases, com potencial para eficientes conversões de materiais lignocelulósicos dentre outras aplicações biotecnológicas. Com isso, as cepas que se destacaram foram identificadas e caracterizadas quanto aos seus secretomas, com o objetivo de gerar novas estratégias para melhorar e desenvolver coquetéis enzimáticos termofílicos eficientes para degradar lignocelulose.

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1. Micro-organismos avaliados

Foram selecionadas 9 novas cepas de fungos termófilos (ASII, FMG6, COQ, S2, FMG1, FMG3, S4, A1I, CO) isolados por Rosa (2014) de solo, insetos errantes e vegetação. Essas estão depositados no banco de fungos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA) da Unesp/IBILCE Câmpus de São José do Rio Preto–SP. Esses isolados já haviam apresentado produção enzimática em fermentação em estado sólido em alguns testes realizados por Rosa (2014). Os organismos foram cultivados em fermentação em estado sólido e fermentação submersa. Esses isolados não haviam sido identificados e explorados, no entanto haviam relatos de produção enzimática em materiais lignocelulósicos por FES descritos por Rosa (2014).

Como parâmetros de produtividade, as cepas referências na produção de celulasas e hemicelulasas foram utilizadas, como o fungo comercial de *Trichoderma reesei* RUT C30 e o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756.

5.3.2. Pré-inóculos e inóculo para as fermentações em estado sólido e submersa

Para o cultivo de cada cepa, foram realizados pré-inóculos em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 50 mL de meio nutriente sólido inclinado agar batata dextrosado (P DA).

Cada linhagem foi incubada em sua respectiva temperatura ótima de crescimento: 28 °C para *Trichoderma reesei*, 45 °C para as cepas ASII e S4, 50 °C para a cepa de *T. aurantiacus* CBMAI 756, e 55 °C para as cepas FMG6, COQ, S2, FMG1, FMG3, S4, A1I e CO) crescidas durante 10 dias. As temperaturas ótimas de crescimento foram determinadas por Rosa, (2014).

A mesma quantidade de inóculo (10^5 esporos por mL) foi realizada para cada fungo nos dois tipos de fermentação, respeitando o volume final de solução nutriente de 50 mL para FSm e 20 mL para FES.

5.3.3. Meio de cultivo e fermentações em estado sólido (FES)

Os fungos foram cultivados em 5,0 g de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e palha de milho (1:1:1) p/p. A esta mistura foi adicionada 20 mL de solução nutriente (proporcionando uma umidade inicial de cerca de 70%) composta por (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,5); KH_2PO_4 (3,0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); CaCl_2 (0,5), Tween 80 (10,0), sendo o pH ajustado para 5,0. Os substratos foram lavados e secos a a temperatura ambiente com circulação de ar. O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e a palha de milho foram triturados e peneirados, sendo utilizadas partículas de 1 a 3 mm. O farelo de trigo utilizado apresentou aproximadamente 0,5 mm.

5.3.4. Meio de cultivo e fermentações submersa (FSm)

Os fungos foram cultivados em 1g da mesma fonte de carbono e solução nutriente citada no item 5.4.3. No entanto, o volume adicionado de solução nutriente foi de 50 mL, o que representou uma porcentagem de substrato de 2% (m/v).

5.3.5. Produção das enzimas por FES

Em FES, a dosagem enzimática ocorreu nos tempos de 72, 144 e 240 horas. Em cada duplicata de cada ponto, adicionamos 100 mL de água destilada para a recuperação das enzimas produzidas. Essa solução foi mantida sob agitação a 100 rpm, em temperatura ambiente, por 60 minutos. Após este período, o material foi filtrado em tecido *nylon*, centrifugado a 10000 x.g por 15 min, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

5.3.6. Produção das enzimas por FSm

Em FSm, os cultivos também foram monitorados em 3 tempos: 72, 144 e 240 horas. No fim de cada tempo de fermentação, todo o extrato foi filtrado em tecido *nylon*, centrifugado

a 10000 x *g* por 15 min, a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas.

5.3.7. Atividades enzimáticas de endo-xilanase, CMCase, β -glicosidase e β -xilosidase

Atividades enzimáticas para xilanase, CMCasease, β glicosidase e β -xilosidase foram realizadas para todos os extratos enzimáticos obtidos. As reações foram incubadas a 60°C para os fungos termofílicos e a 50 °C para *T. reesei* RUT-C30.

As atividades enzimáticas foram determinadas em ensaios contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução de substrato xilana Birchwood 1% (Sigma X0502) para atividades de xilanase e carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) 4% para atividade de endoglucanase (CMCase). Todos os ensaios foram tamponados em acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, realizados em triplicata, e cada extrato enzimático foi incubado por 10 minutos. Então, o ensaio foi interrompido pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller, (1959).

Os ensaios atividades de β -glicosidase e β -xilosidase foram realizadas utilizando 0,05 mL do extrato enzimático secretado mais 0,25 mL de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 0,25 mL de 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (4 mM) para a atividade de β -glicosidase ou 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (4 mM) (Sigma) para a atividade de β -xilosidase. As reações foram mantidas por 10 minutos, e então interrompidas com a adição de 2 mL de solução de Na₂CO₃ (2M). Os produtos formados foram quantificados por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade (U) de β -glicosidase e β -xilosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenil por minuto, nas condições de ensaio.

5.3.8. Identificação das cepas selecionadas

5.3.8.1. Extração do DNA genômico dos isolados

Após a seleção dos fungos para a identificação molecular dos isolados FMG6, COQ e da cepa *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 (confirmação da espécie), extraímos o DNA genômico a partir do crescimento de massa micelial em meio de cultura líquido contendo 0,2% de peptona e 1% glicose durante 4 dias à 50 °C. O cultivo foi centrifugado e a massa micelial utilizada para a maceração com nitrogênio líquido. Em microtubos de 2 mL, 40 mg de micélio macerado foi pesado e ressuspensionado em 900 μ L de solução tampão (NaCl 100 mM, tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,0, e EDTA 1 mM) contendo 2% (m/v) de SDS, 40 μ L de proteinase K (12 mg/mL) e 20 μ L de RNase (10 mg/mL) e incubado a 60 °C por 45 minutos para lise celular.

Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de fenol tamponado, logo após foi realizada centrifugação a 14.000 x *g* por 5 minutos a 4 °C. Da fase superior aquosa foi coletada 500 µL e transferida para outro microtubo, e adicionado 500 µL de clorofórmio após isso foi centrifugado a 10.000 x *g* por 5 minutos a 4 °C.

A fase superior aquosa foi coletada e transferido para outro microtubo, adicionado-se 40 µL de acetato de sódio 3 M e 1,2 mL de etanol resfriado. Em seguida, os microtubos foram incubados a -80 °C por 30 minutos e centrifugados a 14.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C, para precipitação do DNA.

Após descarte do sobrenadante, o DNA genômico aderido na parede do tubo foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 14.000 x *g* por 5 minutos a 4 °C e deixado por 5 minutos a temperatura ambiente em concentrador (Concentrator Plus SpeedVac® -Eppendorf) para eliminação do etanol. O DNA genômico obtido foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, e EDTA 1 mM) e quantificado por espectrofotometria (Nanodrop 2000c – Thermo Scientific) a 260 nm. A integridade e pureza dos DNAs genômicos extraídos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 1X (tampão Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8,3), a 90 V por 1 hora.

Os géis de agarose foram corados com solução de brometo de etídio (0,25 µg/mL) por 20 minutos e visualizados sob iluminação ultravioleta em fotodocumentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream). As amostras foram armazenadas a -20 °C até a utilização.

5.3.8.2. Amplificação da região intergência (ITS) do rDNA das espécies selecionadas

A amplificação da região ITS 1 e 4 (*Internal Transcribed Spacer*) região do DNA que codifica o RNA ribossomal (rRNA) e é utilizada como “barcode” de identificação molecular de fungos, foi feita por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com a utilização dos *primers* ITS1 e ITS4 descritos por (Gardes; Bruns; 1993).

As reações continham 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific), 0,2 mM de dNTP mix, 10 pM de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão PCR 1X (tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50mM), 2 mM de MgCl₂ e água Milli-Q estéril completando o volume final de 50 µL na reação além de 100 ng de DNA genômico. As amplificações por PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler Pro S (Eppendorf). As condições nas quais a reação de PCR foi realizada foram as seguintes: 96°C, por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 96°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e meio e 72°C por 2 minutos, com extensão final de 72°C por 4 minutos. A avaliação do material obtido foi feita através da amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de um marcador *Gene Ruler* de 1Kb.

5.3.8.3. Sequenciamento e análise do amplificado da região intergênica (ITS)

As bandas com tamanho de interesse foram excisadas do gel e purificadas com o kit de purificação Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com as especificações do fabricante.

O produto de PCR purificado foi submetido à reação de sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos iniciadores citados anteriormente e o oligonucleotídeo iniciador 907r (5'CCGTCAATTCMTTTRAGTTT 3'). As reações de sequenciamento foram feitas com o reagente BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) segundo as instruções do fabricante e analisadas no sequenciador automático DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

O programa Geneious versão 6.1.5 (Biomatters) foi utilizado para analisar as sequências obtidas. Estas foram comparadas, pela ferramenta BLAST N (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), com outras sequências depositadas no GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para a análise filogenética, as sequências ITS obtidas neste estudo e outras sequências, selecionadas de trabalhos já publicados, foram alinhadas usando o programa CLUSTAL W (LARKIN et al., 2007). A análise filogenética foi construída pelo programa MEGA v 6.0 usando o algoritmo *neighbor-joining* e o modelo de substituição de nucleotídeo Kimura 2-P (KIMURA, 1980). A estabilidade dos relacionamentos na árvore filogenética foi obtida usando reamostragem (*Bootstrap*) com 1.000 repetições.

5.3.9. Análise do secretoma fúngico por espectrometria de massa

5.3.9.1. Produção, quantificação e SDS-PAGE das proteínas totais do secretoma enzimático dos fungos

Os extratos total secretados pelos fungos identificados foram submetidos à análise do perfil de proteínas em (SDS-PAGE) a partir da produção em triplicata biológica para *T. arantiacus* CBMAI 756 (50 °C) *R. composticola* FMG6 (55 °C) e *R. emersonii* COQ (50 °C) com 240 horas de fermentação utilizando a fonte de carbono complexa de farelo de trigo, palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar (1:1:1).

As amostras foram individualmente padronizadas em 12 µg de proteínas totais após dosagem com metodologia de (Bradford, (1976). Para cada amostra da triplicata de fermentação dos fungos foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 0,1% (p/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel de separação foi preparado em 12%

(p/v) enquanto o gel de empilhamento foi preparado a 4% (p/v). A eletroforese foi realizada a 110 V por aproximadamente uma hora e meia em cuba vertical Bio Rad Mini-Protean System Cell.

Os géis foram corados por 30 min em uma solução de 0,2% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G 250, 10% (v/v) de ácido acético e 50% (v/v) de etanol. Posteriormente, o gel foi lavado com água destilada e imerso em uma solução de etanol a 50% (p/v) e ácido acético a 10% (p/v) por 45 min. Todo o processo foi realizado sob agitação de 50 rpm.

5.3.10. Digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas

A digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas foi realizada por faixa de gel SDS, ou seja, por amostra de cada réplica, foram cortadas seis bandas. Em cada fragmento de gel (banda) foram adicionados 500 µL da solução descorante (*destain*) permanecendo no tempo de 2 horas a temperatura ambiente para a remoção do SDS. Após essa etapa, as bandas foram desidratadas com 200 µL de acetonitrila por 5 min, reduzidas com uma solução de solução de ditioneitol (DTT) no volume de 30 µL em 30 min, e alquiladas com a solução de iodoacetoamida (IAA) também no volume de 30 µL de e tempo de 30 min. Logo após, as bandas foram lavadas por 10 min com uma solução de bicarbonato de amônio na concentração de 100 mmol/L. Em seguida, utilizando acetonitrila, foi realizada uma nova desidratação. Posteriormente, reidratamos as bandas com bicarbonato de sódio.

Para a digestão de proteínas, foi utilizada uma solução de tripsina na concentração de 1 mg/mL em amônio a 50 mmol/L, 30 µL foram utilizados por amostra na qual permaneceram incubadas por 12 horas a 37 °C. Após a digestão por tripsina, 10–30 µL da solução de extração denominada 1, (5% de ácido fórmico), foram adicionados a cada microtubo, seguido por incubação de 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, após uma centrifugação rápida, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo. Em cada amostra foram adicionados um volume de 12 µL da solução 2 de extração, contendo 5% ácido fórmico em 50% acetonitrila sendo sobrenadante novamente transferido. Este último passo foi repetido, seguido pela evaporação das amostras em sua totalidade em *speed vac*. As amostras evaporadas foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento de injeção no espectrômetro de massas.

5.3.11. Cromatografia líquida acoplada em linha à espectrometria de massa (LC-MS/MS)

Para cada amostra mantida no freezer -20 ° C, 12 µL solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) foram utilizados para ressuspender. Dessa mistura de peptídeos, foram utilizados 4,5 µL para injetar no cromatógrafo RPNanoUPLC (nanoAcquity, Waters). Para a separação de populações de peptídeos, utilizou-se a nanocoluna analítica C18 (100 x 100 mm).

Os peptídeos eluídos da coluna C18 foram injetados no espectrômetro de tempo de voo quadrupolo Q-ToF (Ultima Mass Spectrometer Waters). O aparelho foi operado no “modo de três principais MS e MS/MS” (Ultima Mass Spectrometer, software Waters). Com o software MassLynx v.4.1 (Waters, Milford, MA, EUA), os espectros foram obtidos e com o software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.), foi realizada a conversão dos dados brutos para o formato *.mgf (*peak list format*).

Os espectros foram adquiridos usando o software MassLynx v.4.1 (Waters, Milford, MA, EUA), e os dados brutos foram convertidos para o formato *.mgf pelo software Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.). Os dados gerados foram analisados pelo software Mascot v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.) e foram contrastados com os bancos de proteínas adicionados.

Para a análise dos secretomas do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756, o banco de proteínas utilizado foi o da cepa *T. aurantiacus* v1.0 depositado no *Joint Genome Institute* (JGI). Para o fungo *Rasamsonia emersonii* COQ, o banco de proteínas utilizado foi o da cepa *R. emersonii* CBS 393.64 depositado no NCBI. Para o novo fungo *Rasamsonia composticola* FMG6, no qual ainda não existe estudos de seu secretoma e genoma foram utilizadas todas as proteínas de fungos depositadas até o presente momento no NCBI.

Os dados gerados pelo programa *Mascote* foram utilizados no software *Scaffold* (versão 4.0.7, Proteome Software Inc. Portland, OR) para identificar as proteínas dos secretomas analisados das três espécies de fungos. No *Scaffold*, os parâmetros para identificar uma proteína foram definidos para se obter uma probabilidade proteica mínima de 99%, com um mínimo de um peptídeo exclusivo para identificar proteínas, sendo cada um com 95% de certeza. A taxa de descoberta falsa (FDR) de peptídeos de proteínas foi igual a 0,17% para *T. aurantiacus* 0,11% para as amostras de *R. emersonii* COQ, 0,66% para *R. composticola* FMG6

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. Substrato indutor utilizado para fermentação

Para selecionar e identificar potenciais fungos termófilos produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, os 9 isolados foram cultivados em comparação as cepas referências de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (posteriormente adotado como modelo de estudo e aprimoramento) e o fungo *T. reesei* RUT C30, reconhecidas pela eficiente produção de enzimas hemicelulíticas e celulolíticas em material lignocelulósico altamente complexo.

Em nossos resultados a fonte de carbono utilizada, composta pela mistura de bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo, foi eficiente para a produção das enzimas CMCase, β -glicosidase, xilanase e β -xilosidade em todas as linhagens fúngicas avaliadas em pelo menos um tipo de fermentação. Os resíduos ligno-celulósicos utilizados neste estudo foram selecionados com base nos trabalhos que utilizaram resíduos lignocelulósicos.

Johnson et al. (2016) relataram que extratos enzimáticos produzidos a partir de substratos complexos, como a palha de trigo, possuem alta atividade enzimática quando comparados com açúcares simples utilizados no trabalho (glicose e sacarose). Dos Santos et al. (2016) empregaram cana-de-açúcar sem pré-tratamento para induzir a produção de enzimas em *Myceliophthora thermophila*, que após análises de proteômica foi identificado um conjunto abrangente de enzimas envolvidas para a hidrólise e oxidação de celulose, hemicelulose pectina e lignina, demonstrando a importância dessa biomassa na indução de um arsenal enzimático completo. Da Silva et al. (2005) aplicaram palha de milho como substrato para a produção de avicelase, CMCase e xilanase em *T. aurantiacus* em fermentação sólida.

Deste modo, os fungos que possuem uma capacidade de secreção enzimática podem ter essa capacidade melhorada, com a indução por substratos complexos (PULLAN et al., 2014). Assim, em nossos estudos é justificada a combinação das três biomassas lignocelulósicas na formação de um substrato altamente complexo, para favorecer a indução de CAZymes.

5.4.2. Atividade enzimáticas dos extratos enzimáticos produzido por FES e por FSm

Após a produção dos extratos e dosagem das atividades enzimáticas CMCase, β -glicosidase, endo-xilanase e β -xilosidade, observou-se que *T. aurantiacus* CBMAI 756 destacou-se por ser a cepa que produziu as maiores quantidades atividades enzimáticas (U/mL) encontradas, tanto por FES (Tabela 1) quanto por FSm (Tabela 2). A exceção ocorreu apenas para a atividade de β -xilosidade em FSm (Tabela 2), no qual *T. reesei* RUT C-30 apresentou a maior atividade de β -xilosidade ($2,07 \pm 0,041$ U/mL em 144 horas) que *T.*

aurantiacus CBMAI 756 ($1,27 \pm 0,21$ em 144 horas). Nossos resultados mostraram que as maiores atividades enzimáticas foram em FES, sendo o fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756 melhor produtor. Para a fermentação FSm este fungo também apresentou uma atividade enzimática produzida. Nossos resultados corroboraram com os dados obtidos por Da Silva et al. (2005) que obtiveram extratos produzidos por FES de *T. aurantiacus* CBMAI 756 em diferentes resíduos lignocelulósicos, nos quais foram encontradas maiores atividades de xilanase e CMCase, em comparação a extratos produzidos por FSm.

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 (*T. aurantiacus* CBMAI 756), TR (*T. reesei* RUT C-30) e isolados por Rosa, (2014): ASII/FMG6/COQ/S2/FMG1/FMG3/S4/A1I/CO. Atividades enzimáticas não detectadas representadas pela sigla ND.

		TA	ASII	FGM6	COQ	S2	FMG1	FMG3	S4	A1I	TR	CO
xil	72h	241,69 ±2,82	122,79 ±5,86	10,01 ±1,04	36,6 ±3,95	4,72 ±0,8	68,23 ±5,88	227,11 ±0,9	187,42 ±11,19	264,22 ±6,48	7,65 ±0,46	20,03 ±1,42
	144h	564,13 ±4,09	247,14 ±4,23	96,43 ±4,09	57,77 ±8,19	10,59 ±0,82	57,65 ±2,26	352,71 ±5,22	270,6 ±16,95	269,06 ±13,04	41,35 ±5,08	122,45 ±7,63
	240h	626,79 ±8,39	199,09 ±10,45	78,83 ±2,67	84,56 ±5,93	30,20 ±1,94	119,5 ±12,32	296,57 ±12,88	188,63 ±11,02	150,91 ±19,75	71,9 ±5,37	299,76 ±12,46
β -xi	72h	0,41 ±0,01	0,41 ± 0,01	0,116 ±0,01	0,52 ±0,0021	0,06 ±0,007	ND	0,053 ±0,0051	0,066 ±0,007	0,08 ±0,003	0,23 ±0,012	0,049 ±0,004
	144h	0,68 ±0,02	0,6 ± 0,02	0,41 ±0,01	0,31 ±0,011	0,06 ±0,006	ND	0,10 ±0,01	0,063 ±0,006	0,066 ±0,006	0,23 ±0,066	0,09 ±0,006
	240h	0,83 ±0,03	0,8 ±0,03	0,46 ±0,02	0,53 ±0,019	0,10 ±0,011	ND	0,08 ±0,008	0,19 ±0,011	2,18 ±0,36	0,19 ±0,07	0,06 ±0,0039
End	72h	4,39 ±0,29	2,62 ±0,02	2,23 ±0,1	8,35 ±0,64	0,38 ±0,010	0,52 ±0,07	1,03 ±0,05	6,18 ±0,07	1,82 ±0,22	2,02 ±0,26	0,81 ±0,024
	144h	6,88 ±1,05	7,11 ±0,5	4,13 ±0,06	33,23 ±0,68	0,43 ±0,017	0,97 ±0,05	1,13 ±0,015	16,11 ±2,64	0,58 ±0,01	3,65 ±0,12	1,96 ±0,66
	240h	67 ±4,82	23,72 ±2,15	4,52 ±0,33	56,7 ±0,38	0,52 ±0,031	0,75 ±0,14	4,66 ±0,37	9,91 ±1,27	0,80 ±0,08	14,28 ±0,64	0,65 ±0,005
β -gli	72h	10,35 ±0,99	0,57 ±0,06	1,16 ±0,01	1,35 ±0,05	0,57 ±0,050	0,076 ±0,03	1,71 ±0,042	0,77 ±0,074	3,72 ±0,57	0,16 ±0,01	0,35 ±0,039
	144h	15,18 ±1,06	0,39 ±0,16	2,71± 0,28	2,23 ±0,087	0,52 ±0,024	1,74 ±0,38	2,22 ±0,027	0,61 ±0,33	3,53 ±0,25	0,22 ±0,02	0,88 ±0,05
	240h	10,65 ±1,18	0,36 ±0,24	3,04± 0,1	2,67 ±0,38	0,96 ±0,044	3,02 ±0,43	4,87 ±0,23	0,77 ±0,31	7,83 ±0,26	0,24 ±0,0018	0,99 ±0,03

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 (*T. aurantiacus* CBMAI 756), TR (*T. reesei* RUT C-30) e isolados por Rosa, (2014): ASII/FMG6/COQ/S2/FMG1/FMG3/S4/A1I/CO. Atividades enzimáticas não detectadas representadas pela sigla ND.

		TA	ASII	FGM6	COQ	S2	FMG1	FMG3	S4	A1I	TR	CO
xil	72h	11,89 ±0,62	26,62 ±1,54	46,71 2,03	29,16 ±4,85	0,825 ±0,018	42,47 ±7,29	47,62 ±0,44	37,18 ±4,88	14,18 ±0,76	19,26 ±3,75	7,43 ±0,40
	144h	104,8 ±4,29	105,46 ±20,93	35,81 ±4,38	90,61 ±9,62	0,754 ±0,035	28,53 ±1,48	65,17 ±5,2	43,87 ±7,89	12,2 ±0,99	26,24 ±5,24	29,38 ±0,99
	240h	245,2 ±11,72	141,41 ±17,65	30,37 ±0,63	186,52 ±23,65	0,71± 0,15	59,33 ±4,97	58,05 ±2,28	24,41 ±3,71	88,04 ±2,71	56,5 ±0,42	63,48 ±2,51
β -xi	72h	0,11 ±0,076	ND	0,11 ±0,008	0,15 ±0,039	ND	ND	ND	ND	ND	1,098 ±0,027	ND
	144h	1,27 ±0,21	ND	0,15 ±0,01	0,3 ±0,0018	ND	ND	ND	0,032 ±0,008	ND	1,54 ±0,009	ND
	240h	0,92 ±0,03	0,14 ±0,068	0,25 ±0,008	0,03 ±0,033	ND	ND	ND	0,027 ±0,064	ND	2,07 ±0,041	ND
End	72h	3,00 ±0,04	1,65 ±0,45	3,2 ±0,109	2,15 ±1,4	0,3 ±0,0057	0,32 ±0,04	0,63 ±0,02	2,78 ±0,3	0,45 ±0,06	1,6 ±0,82	0,37 ±0,018
	144h	18,07 ±0,11	22,14 ± 3,39	4,5 ±0,122	12,22 ±4,7	0,37 ±0,01	0,55 ±0,087	0,71 ±0,057	3,45 ±0,25	0,53 ±0,18	3,08 ±0,004	0,47 ±0,031
	240h	49,23 ±2,21	41,97 ± 4,92	4,72 ±0,267	27,14 ±0,78	0,3 ±0,028	0,5 ±0,14	0,63 ±0,015	3,16 ±0,0086	0,6 ±0,016	4,15 ±0,19	0,6 ±0,058
B-gi	72h	0,55 ±0,09	0,02 ± 0,041	3,29 ±0,385	0,39 ±0,076	ND	ND	1,21 ±0,18	0,85 ±0,27	ND	0,054 ±0,001	0,097 ±0,072
	144h	8,28 ±0,06	2,78 ± 0,91	1,289 ±0,51	3,88 ±0,082	ND	0,29 ±0,083	1,93 ±0,13	2,54 ±0,13	0,018 ±0,03	0,07 ± 0,0003	0,17 ±0,05
	240h	14,06 ±0,52	2,9 ±0,64	1,89 ±0,06	2,02 ±1,02	0,017 ±0,0056	2,54 ±0,29	2,56 ±0,172	4,28 ±1,12	0,08 ±0,01	0,89 ± 0,025	1,27 ±0,19

Grajek, (1987), ao comparar as atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos fúngicos, mostrou que *T. aurantiacus* foi o maior produtor por FES nas atividades de exo- β -glucanase, endo- β -glucanase e β -D-glicosidase, em comparação com os fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus*, *Allescheria terrestris*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor pusillus*, *Sporotrichum thermophile*. No entanto, em FSm, a sua produção foi maior apenas para β -D-glicosidase. Ainda, Grajek em 1987, relataram que a produção de β -xilosidase de *T. aurantiacus* foi 1,14 U/mL; a mais baixa quando comparada a *Aspergillus fumigatus* (1,21U/mL), *Allescheria terrestris* (2,66 U/mL), *Sporotrichum thermophile* (15,01 U/mL) e *Humicola laguginosos* (18,72 U/mL) produzidos por FSm utilizando beterraba sacarina como fonte de carbono durante 72 horas.

Além disso, Brienzo, (2010) produziu extratos enzimáticos de *T. aurantiacus*, *Aspergillus niger* e *T. reesei* em farelo de trigo por FES e verificou que *T. aurantiacus* produziu as menores atividades para β -xilosidase nos extratos com a mesma carga enzimática de xilanase. Assim, ao hidrolisarem individualmente o bagaço de cana-de-açúcar com os três extratos dosados e na mesma quantidade de xilanase, constatou-se que o extrato de *T. aurantiacus* produziu menor atividade de β -xilosidase, menor concentração de xilose formada e maior teor de xiloligômeros, em comparação com os extratos de *A. niger* e *T. reesei*.

Em nossos experimentos, a única atividade não detectada nos extratos produzidos por FES, foi a atividade de β -xilosidase do isolado FMG1 (Tabela 1). Nos extratos produzidos por FSm, não detectamos a atividade de β -glicosidase em pelo menos um dos tempos para 3 isolados (S2, FMG1, A1I).

Para a atividade de β -xilosidase nos extratos produzidos por FSm, não foi possível detectar, em pelo menos um dos tempos de cultivo, em sete isolados (ASII, S2, FMG1, FMG3, S4, A1I e CO) (Tabela 2). Esse resultado destaca as cepas de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *T. reesei* RUT C-30, COQ e FMG6 por produzir β -xilosidase nos dois tipos de fermentação e em todos os tempos avaliados. Ou seja, foram as únicas cepas que não deixaram de produzir nenhuma das quatro enzimas avaliadas em todos os tempos pesquisados, sendo o destaque principalmente para FSm, o tipo de fermentação de maior importância para os bioprocessos industriais.

A produtividade enzimática por FES em fungos filamentosos é relatada como maior que a produtividade em FSm. No entanto, 90% dos formulados enzimáticos industriais são produzidos por FSm (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010; DE SIQUEIRA et al., 2010; SINGHANIAA et al., 2010). Esse fato é decorrente por FSm ser um processo que

industrialmente apresenta diversas vantagens sobre FES, dentre elas: maior possibilidade de controle dos parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, umidade devido ao alto teor de água, crescimento da massa celular, melhor recuperação de metabólitos e maior absorção de nutrientes (BRIJWANI; VADLANI, 2011; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Ademais, a técnica de produção de enzimas por FES é pouco aplicada industrialmente, pois os biorreatores disponíveis comercialmente para tal finalidade não são comuns, sendo alvo ainda de estudo e desenvolvimento (CASCIATORI, 2015).

5.4.3. Seleção das cepas potenciais para identificação molecular

No contexto da importância da produção enzimática em FSm e a partir dos resultados obtidos na Tabela 2, selecionamos cepas com a capacidade e potencialidade escalonável de produzir enzimas em processos industriais.

T. aurantiacus CBMAI 756 foi selecionado por apresentar extratos com as maiores atividades enzimáticas em pelo menos um dos tempos propostos, quando comparado a outras cepas termofílicas pesquisadas por FSm (Tabela 2). A cepa *T. aurantiacus* CBMAI 756 foi a maior produtora de xilanase (240 horas), endoglucanase (240 horas) e β -glicosidase (240 horas), sugerindo ser um extrato potencial em atuar eficientemente na desconstrução de polímeros de materiais lignocelulósicos em altas temperaturas. Brienzo; Arantes; Milagres, (2008) descreveram que *T. aurantiacus* produz altos níveis de uma variedade de enzimas potenciais e de interesse industrial. Nossos resultados destacam o potencial da cepa *T. aurantiacus* CBMAI 756 para utilização em combinações de coquetéis enzimáticos, suplementação enzimática e manipulação gênica. Somados a isso, os isolados FMG6 e COQ apresentaram todas atividades avaliadas, em todos os tempos propostos tanto em extratos com FES e FSm. Assim, esses isolados possuem os melhores coquetéis para produção de um arsenal enzimático completo e diversificado utilizando fontes de carbono baratas.

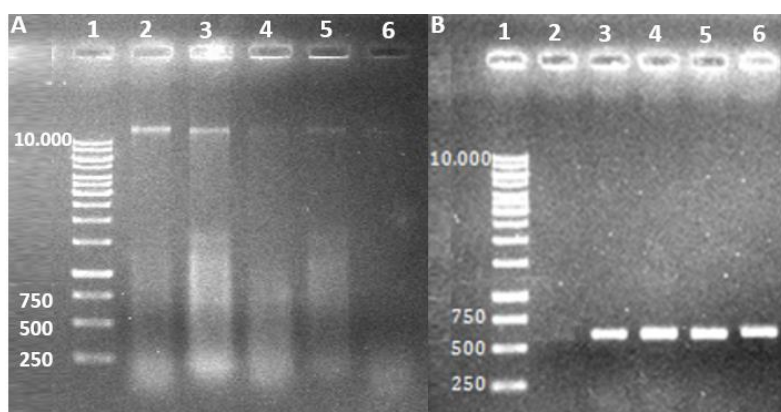
Estes resultados também evidenciam o potencial destes isolados FMG6, COQ e *T. aurantiacus* CBMAI 756 serem industrialmente utilizados para a produção de enzimas em resíduo lignocelulósico para a desconstrução de celulose e hemicelulose e obtenção de açúcares fermentescíveis. Nesse cenário as cepas selecionadas para as próximas etapas deste trabalho foram de *T. aurantiacus* CBMAI756, COQ e FMG6.

5.4.4. Amplificação da sequência parcial do gene ITS-rDNA (ITS), sequenciamento e identificação dos isolados de fungos termofílicos selecionados.

Uma vez selecionado os melhores produtores, deu-se sequência a identificação molecular destes organismos. Para isso, o DNA genômico de cada uma das 3 cepas selecionadas *T. aurantiacus* CBMAI 756, FMG6, COQ, foi extraído. Após a extração dos DNAs, pôde-se verificar a presença de uma banda na porção superior do gel que determina uma condição íntegra do DNA genômico (Figura 6). A eletroforese realizada para avaliar as amostras amplificadas com os iniciadores ITS1 e ITS4 evidenciou a presença de um amplificado de tamanho esperado e correspondente ao amplicon do ITS fúngico (~600pb) (Figura 6).

O sequenciamento parcial do gene ITS-rDNA (ITS) e as análises das sequências foram obtidas com eletroferogramas de boa qualidade. Com as sequências geradas, foi possível construir uma árvore filogenética (Figura 7) para analisar a correlação entre essas sequências e outras depositadas no NCBI.

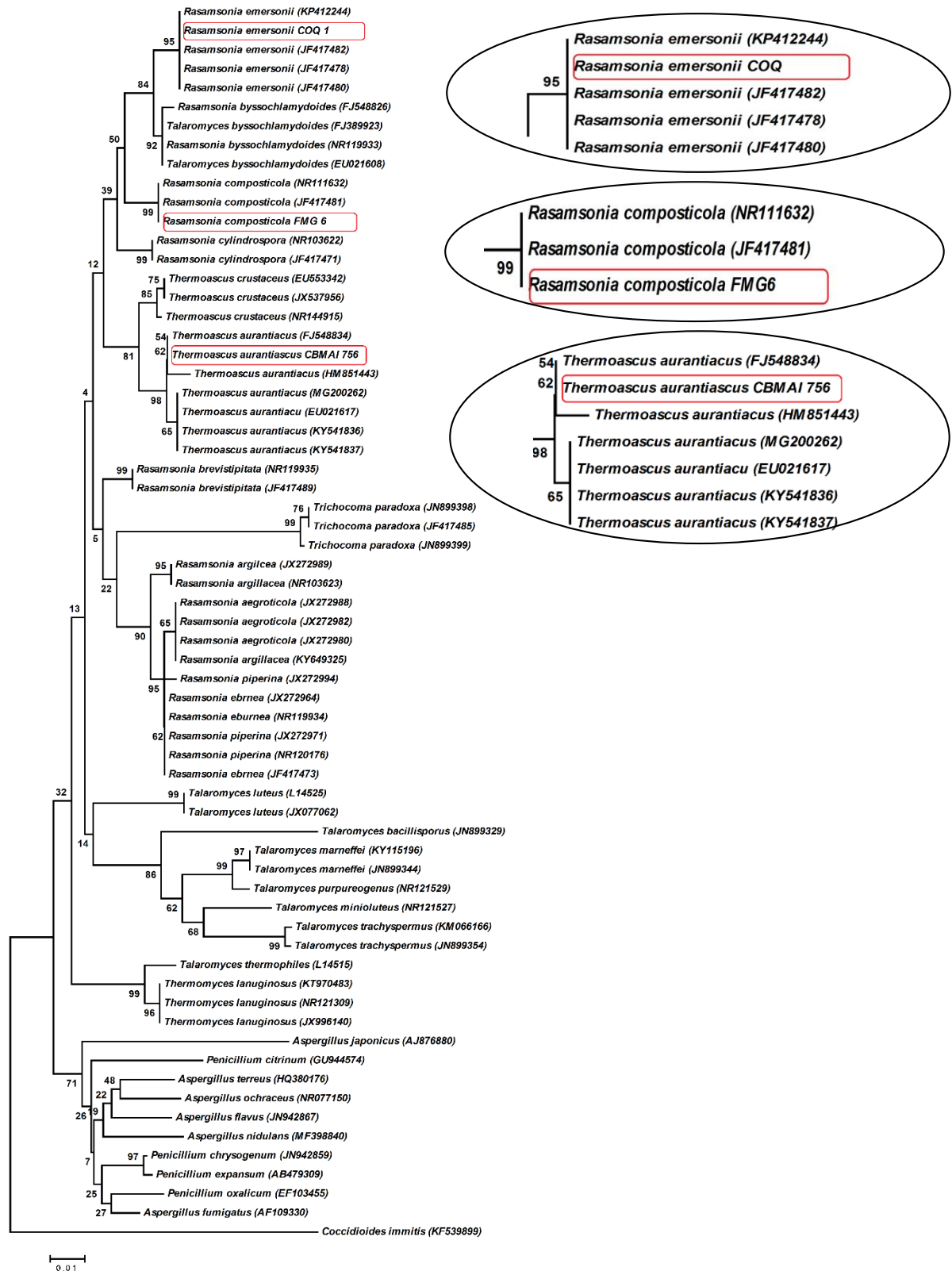
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico (A) e produto de amplificação do gene ITS (B) para os fungos termofílicos selecionados. A. Canaleta 1 – Marcador (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb), canaleta 2 e canaleta 3 - amostras FMG6. Canaleta 4 e Canaleta 5 – Amostra COQ. Canaleta 6 – amostra *T. aurantiacus* CBMAI 756. B. Eletroforese dos produtos de PCR de amplificação parcial do gene ITS-rDNA (ITS), em gel 1% de agarose e detecção de bandas de tamanho esperado de 600 pb. Em ordem: Canaleta 1 – Marcado (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb) Canaleta 2 – controle negativo da reação de PCR. Canaleta 3 – Controle positivo da reação de PCR. Canaleta 4 – Isolado FMG6. Canaleta 5 – Isolado COQ. Canaleta 6 – *T. aurantiacus* CBMAI 756.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As sequências de FMG6 e COQ mostraram estreitas relações filogenéticas com espécies do gênero *Rasamsonia*. A sequência COQ agrupou em um clado unico de sequências de *Rasamsonia. emersonii* e FMG6 com *Rasamsonia composticola* (Figura 7). Na arvore filogenética foram utilizadas as sequencias de ITS do trabalho de Su e Cai (2012),. que descreveram a espécie *R. composticola*. A sequência da cepa de *T. aurantiacus* CBMAI 756 foi agrupada com outras sequências de *T. aurantiacus*. (Figura 7) confirmando sua identificação.

Figura 7. Árvore filogenética dos isolados construída a partir de sequências parciais do gene ITS de cepas fúngicas selecionadas por este trabalho, em comparação com outras sequências ITS depositadas no NCBI.

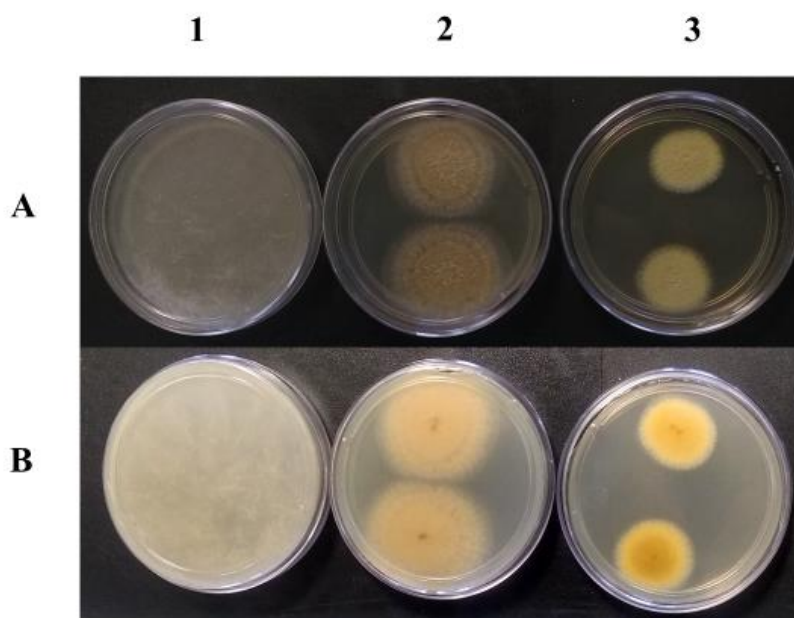


Fonte: Elaborado pelo autor.

Ambos isolados identificados molecularmente como *R. emersonii* COQ e *R.composticola* FMG6 também compartilham características morfológicas e fisiológicas com outras espécies do gênero *Rasamsonia*, como crescimento ótimo entre 45 °C a 55 °C e a pigmentação das colônias (Figura 8) conforme descrito por Su e Cai (2012). Os corpos de frutificação dos fungos *R. composticola* e *R. emersonii* foram característicos do gênero *Rasamsonia* (Figura 9A e B) como os relatados por Houbraken et al. (2012) e Su e Cai (2012) (Figura 9A e B).

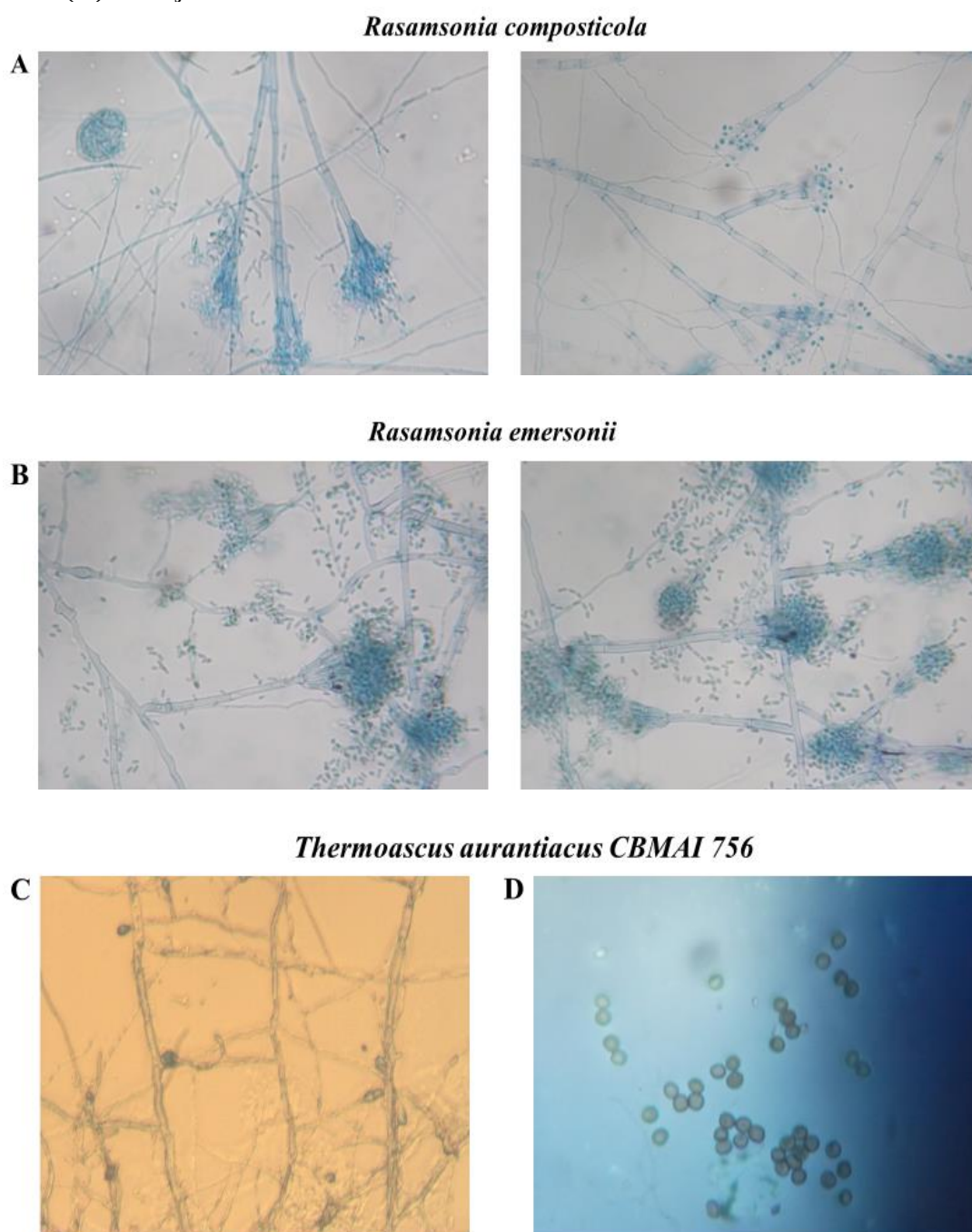
Para a espécie *T. aurantiacus* as características fisiológicas foram confirmadas, como crescimento ótimo a 45 °C e 50 °C além de ascos e ascosporos característicos (Figura 9) (SCHUERG et al., 2017b). A coloração da colônia inicialmente branca e laranja após 144 horas, crescimento ótimo a 50 °C assim como os ascos e ascosporos para a espécie *T. aurantiacus*, demonstraram ser como os descritos por Schuerg et al. (2017a) (Figura 9C e D).

Figura 8. Fungos filamentosos termófilos selecionados em ágar PDA cultivados por 144 horas. 1 *Rasamsonia composticola* FMG6 cultivado a 55 °C, 2 *Rasamsonia emersonii* COQ cultivado a 55 °C, 3 *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 cultivado a 50 °C. A (frente da placa), B (verso da placa).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9. Lâminas analisadas dos fungos filamentosos cultivados em PDA, cultivados em 144 horas e coradas com Coomassie Blue. As fotos foram obtidas através de microscópio óptico nas objetivas de 40X para *Rasamsonia composticola* FMG6 (A) e *Rasamsonia emersonii* COQ (B) Para *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 a fotografia em (C) foi realizada na objetiva de 40X e em (D) na objetiva de 60X.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O gênero *Rasamsonia* apresenta uma importância econômica, no qual se destaca por conter uma importante espécie *R. emersonii*, produtora de enzimas termofílicas de aplicação comercial (COLLINS et al., 2007; FERNANDES; MURRY; TUOHY, 2008; PERKINS et al., 2015).

Rasamsonia emersonii (syn *Talaromyces emersonii*) e *Thermoascus aurantiacus* são relatados como produtores muito promissores de enzimas termoestáveis que são capazes de atuar na sacarificação de biomassas complexas e não complexas (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008; GOMES et al., 2000; HIMMEL; RUTH; WYMAN, 1999; PERKINS et al., 2015). Coquetéis enzimáticos produzidos por essas cepas são potenciais para serem avaliados frente a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Rasamsonia composticola recebe destaque por ser uma espécie termofílica descoberta recentemente, isolada e descrita por Su e Cai (2012) na China. Entretanto, até o presente momento, nenhum exemplar desta espécie havia sido identificado no Brasil. Além disso, não há publicações de nenhuma aplicação e caracterização sobre o arsenal enzimático desta espécie.

Identificamos que a nova linhagem da espécie *R. composticola* apresentou produção de celulases e hemicelulases quando cultivada em material lignocelulósico, tanto por FES quanto por FSm. Assim, o coquetel enzimático de *R. composticola* FMG6 possui um portfólio enzimático termofílico inexplorado, sendo uma promissora fonte de novas enzimas que poderão ser estudadas individualmente ou em conjunto em seu coquetel.

5.4.5. Análise de secretomas por espectrometria de massas

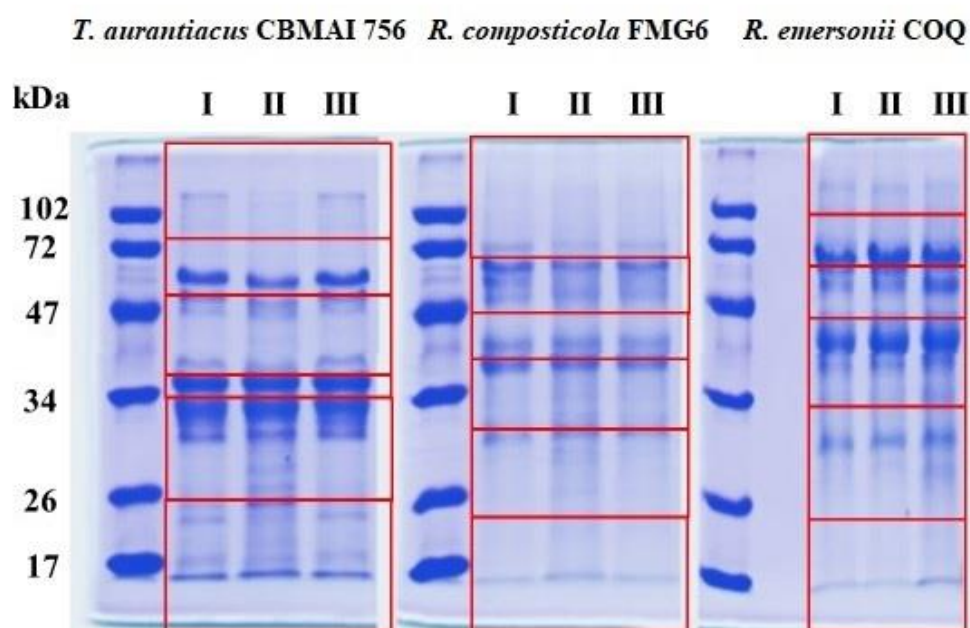
Em função do destaque das cepas termofílicas *T. auratiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ na produção das celulases e hemicelulases em substrato lignocelulósico por FSm - somados a carência de estudos de secretomas completos dessas espécies - buscamos elucidar o conjunto e a proporção de proteínas que compõem seus arsenais enzimáticos. Destaca-se que estes resultados são os primeiros estudos de composição e abundância do repertório enzimático de CAZYmes de *R. composticola* FMG6 e a primeira análise completa das proteínas secretadas por *T. auratiacus* CBMAI 756 e *R. emersonii* COQ cultivados em materiais lignocelulósicos complexos.

A condição de cultivo e os substratos utilizados a fim de se obter extratos para as análises de espectrometria de massas, foram os mesmos utilizados para FSm. Contudo, apenas o tempo de 240 horas (10 dias) foi selecionado para a fermentação das três espécies. Neste

trabalho, este tempo de produção enzimática demonstrou conter os maiores valores de atividade (para os três micro-organismos) em comparação com os outros tempos analisados

A análise dos géis (SDS PAGE) das proteínas totais secretadas pelos fungos *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ, mostrou diferenças na diversidade de proteínas secretadas para cada espécie além de um amplo espectro de massas moleculares (Figura 10).

Figura 10. Perfil proteico em eletroforese de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R.composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ, em bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e palha de milho (1:1:1). O cultivo foi realizado em 240 h de cultura a 50°C para *T.aurantiacus* CBMAI 756, e 55°C para *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ. I, II e III referem-se a cada amostra da triplicata com 12 µg de proteínas. O mesmo marcador com massa molecular foi utilizado nos três fungos. Para análise por LC-MS/MS o gel foi seccionado em 6 partes seguindo a linha vermelha, para cada uma das triplicatas, separadamente, de cada fungo. Para cada banda seccionada a digestão com tripsina foi realizada.



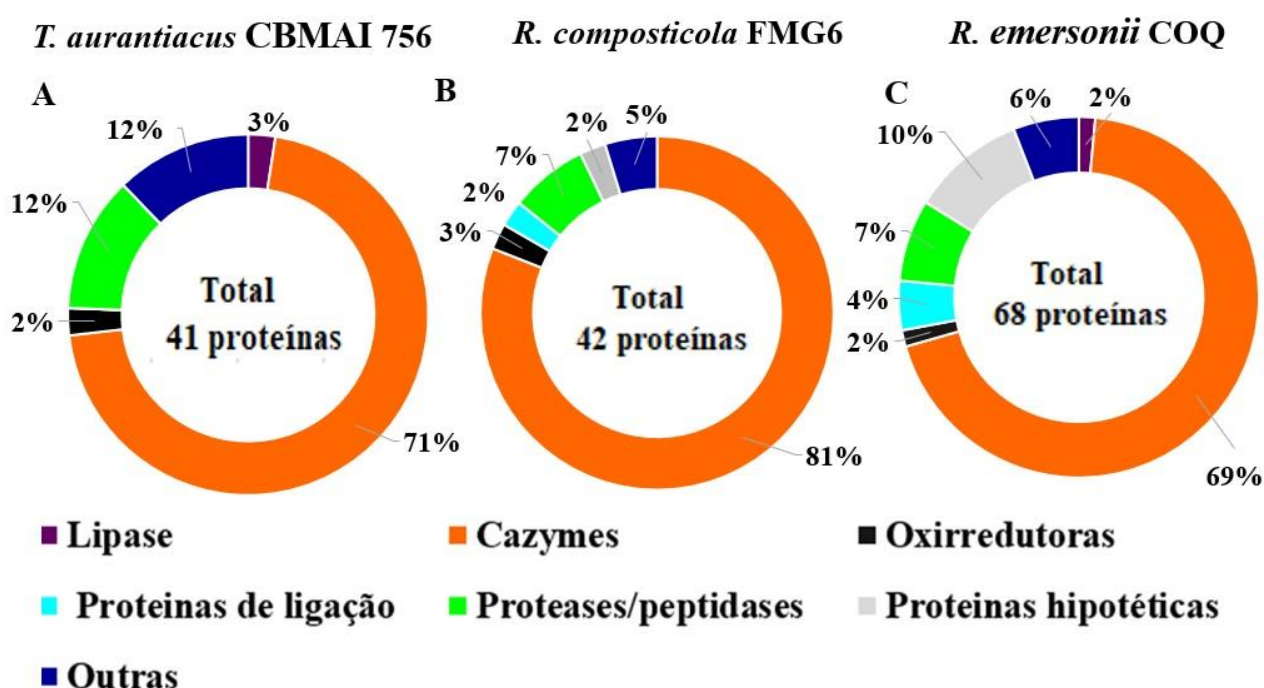
Fonte: Elaborado pelo autor

Diferenças no nível das proteínas individuais que aparecem em maior e menor quantidade para cada espécie também foram evidenciados por dados proteômicos espectrais disponíveis nos anexos deste capítulo (Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5) para *T.aurantiacus* CBMAI 756, *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6, respectivamente).

As análises dos secretomas evidenciaram que o fungo *R. emersonii* COQ possui a maior secreção de proteínas (68 proteínas) em relação ao secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (41 proteínas) e *R. composticola* FMG6 e (42 proteínas) (Figura 11).

Em relação aos perfis de secretomas para os três fungos avaliados neste trabalho, a quantidade majoritária das proteínas encontradas estão envolvidas nas vias de desconstrução de carboidratos (CAZymes) da parede celular vegetal (Figura 11).

Figura 11. Distribuição pelo número total de proteínas identificadas no secretoma das espécies de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (A), *R. composticola* FMG6 (B) e *R. emersonii* COQ (C).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste contexto, para as espécies avaliadas, o substrato composto pela mistura de biomassa vegetal usada neste trabalho foi também eficiente para a grande produção de proteínas ativas em carboidratos (CAZymes). Substratos lignocelulósicos são relatados por serem eficientes indutores da secreção de enzimas ativas em carboidratos, como celulasas e hemicelulasas (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

O elevado percentual de CAZymes encontrado nos secretomas de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ, confirma a capacidade destes organismos produzirem coquetéis eficientes para a sacarificação de biomassas vegetais. Baseados em dados proteômico, genômico e bioquímico, Rubio et al. (2016) relataram que

devido a grande capacidade de produzir uma vasta gama de CAZymes, fungos apresentam grande eficiência de degradação material lignocelulósico.

O fungo *R. composticola* FMG6 mostrou o maior percentual de CAZymes identificadas, com 81% em relação ao seu conteúdo total de proteínas secretadas, destacando-se entre *T. aurantiacus* CBMAI 756 (71%) e *R. emersonii* COQ (69%), dois fungos reconhecidos por apresentarem produção enzimática eficientes para sacarificar material lignocelulósico em altas temperaturas (Figura 11).

Nos secretomas de *T. aurantiacus* CBMAI 756 *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ foram encontrados representantes de CAZymes pertencentes a três grupos: Hidrolases de glicosídeos (GHs), Esterases de carboidratos (CEs) e Atividades auxiliares (AAs). Nenhuma enzima foi classificada no grupo Transferases de Glicosídeos (GTs) para nenhum dos fungos analisados. Apenas no secretoma do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756 uma família do grupo Polissacarídeo Liases (PLs) foi encontrada. A classificação de todas as CAZymes identificadas encontram-se nas Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5 com os respectivos números de acesso de cada uma das proteínas do banco de dados utilizado, a anotação da função obtida por BLAST no NCBI, dbCAM e HMMER, os domínios CAZy, a massa molecular, presença ou ausência de peptídeo sinal e os espectros gerados pela espectrometria de massas para cada uma das réplicas.

Com base nas atividades enzimáticas detectadas e as análises de perfis proteicos funcionais das proteínas secretadas, pode-se afirmar que os três coquetéis fúngicos obtidos por fermentação submersa podem acessar os principais polímeros disponíveis da biomassa como a celulose, hemicelulose e pectina. Os números de CAZymes encontradas nos secretomas de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ foram de 30, 34 e 47 respectivamente (Figura 12).

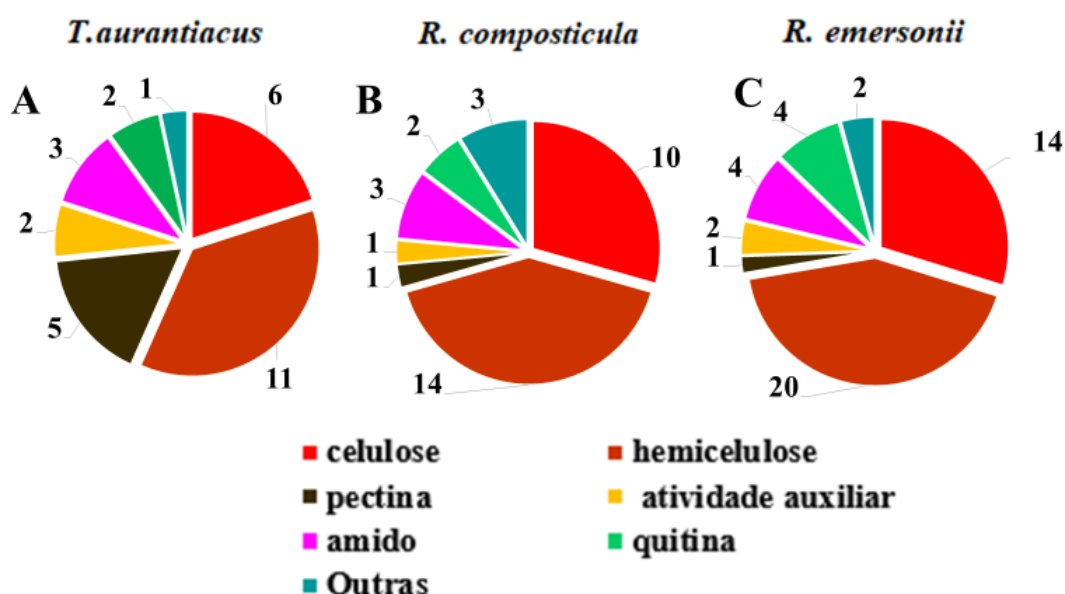
Em relação ao número total de CAZymes encontradas nos três fungos, as celulasas e hemicelulasas são a maioria das enzimas. Para as três espécies as hemicelulasas foram as enzimas encontradas em maior número, representando 36%, 41% e 43% para os secretomas de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ, respectivamente (Figura 12). O número de enzimas identificadas como celulasas representaram 20%, 29% e 30% do número total, para os secretomas de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ, respectivamente.

Ao comparar as atividades enzimáticas em fermentação submersa (240 h) (Tabela 2) com o número de enzimas detectadas nos secretomas, constatamos que o arsenal enzimático de *T. aurantiacus* foi o que apresentou maior atividade enzimática para xilanase e para beta-

xilosidase em comparação aos extratos de *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ. No entanto, os fungos do gênero *Rasamsonia* apresentaram os maiores números de CAZymes preditas para atividades em hemicelulose. O mesmo ocorreu com as atividades para endoglucanase e para beta-glicosidase em relação ao número de CAZymes preditas. Assim, *T. aurantiacus* CBMAI 756 apresentou um portfólio enzimático com menor quantidade de celulases, no entanto foi o secretoma que apresentou as maiores atividades celulásicas em relação a *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ.

Estes resultados evidenciam em *T. aurantiacus* CBMAI 756 a eficiência de suas enzimas termoestáveis, assim como as proporções e quantidades encontradas em seu secretoma.

Figura 12. Número de CAZymes identificadas no secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ separadas por tipo de atividade na desconstrução de diferentes carboidratos. Este mapa inclui apenas enzimas/proteínas classificadas pelo banco de dados CAZy.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação à produção das enzimas atuantes na desconstrução da pectina identificadas nos secretomas das espécies avaliadas, *T. aurantiacus* CBMAI 756 se destacou com 17% do número total de CAZymes identificadas, contra de 3% de *R. composticola* FMG6 e 2% de *R. emersonii* COQ (Figura 12).

O estudo do secretoma de *T. reesei*, em uma análise quantitativa por Adav; Chao; Sze, (2012) demonstrou que a porcentagem de CAZymes foi constituída de 31,3% para celulases, 17,91% de hemicelases, 13,43% de proteínas degradadoras de lignina, 22,01% de peptidases e proteinases. Portanto, 49,25% das CAZymes encontradas no secretoma de *T. reesei* atuam na sacarificação de celulose e hemicelulose, quando induzido por materiais lignocelulósicos. *T. reesei* é um dos principais fungos utilizados comercialmente para a produção de enzimas, sendo considerado um dos maiores produtores de celulases industriais.

Entretanto, nas condições estabelecidas deste estudo, o secretoma das três espécies estudadas produziu uma porcentagem de celulases somadas a hemicelulases de 56%, 70%, 73% do total de CAZymes, respectivamente para os fungos *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ. Esses resultados são superiores aos encontrados nos estudos de Adav; Chao; Sze, (2012), que avaliam *T. reesei* um dos melhores fungos para a produção comercial de enzimas. Esses resultados demonstraram o potencial dessas cepas em serem futuramente base de uma plataforma de coquetéis comerciais termofílicos para a desconstrução da biomassa.

Os resultados encontrados na Figura 12 confirmam que as CAZymes preditas no secretoma das cepas de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ, podem acessar diversos substratos que compoem a biomassa vegetal. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados na Tabela 2, pois essas cepas foram selecionadas por apresentarem a produção de todas as principais atividades enzimáticas importantes para a desconstrução de material lignocelulósico.

O destaque é principalmente para o potencial do arsenal enzimático de *R. composticola*, até então desconhecido. De forma geral, a análise secretômica sugere que as CAZymes preditas para *R. composticola*, acessam a mesma diversidade de substratos que os coquetéis de *T. aurantiacus* e *R. emersoni*, considerados altamente eficientes e promissores produtores de enzimas termofílicas destinadas à desconstrução agroresíduos compostos por materiais lignocelulósicos.

5.4.6. Análise global do perfil das famílias de CAZymes expressas.

Até o momento, foi realizada uma análise global da abundância proteica dos secretomas estudados neste trabalho. A partir deste tópico, conforme Visser et al. (2015), as famílias de CAZymes foram classificadas por pela contagem média de espectros, para a quantificação relativa da expressão de proteínas encontradas em cada secretoma, Os espectros encontrados para cada proteína identificadas no secretoma de *T. arantiacus* CBMAI 756, *R.*

No secretoma do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756, as proteínas identificadas que apresentam atividades preditas sobre a hemicelulose foram classificadas nas famílias GH10 (endo-1,4-beta-xilanase), GH3 (beta- xilosidase), CE16 (acetil xilano esterase), GH67 (alfa-glucuronidase), GH79 (beta-glucuronidase), CE15 (glucuronoil esterase), CE1 (carboxil esterase), GH51 (alfa-L-arabinofuranosidase), GH27 (alfa-galactosidase), GH47 (alfa-mannosidase) e GH35 (beta-galactosidase).

As proteínas com atividades sobre celulose foram classificadas nas famílias GH7 (celobiohidrolase), GH5 (endoglucanase), GH3 (beta-glicosidase), GH16 (Endo-1,3-beta-glucanase), GH17 (exo-beta-1,3-glucanase). Em menor quantidade, as proteínas com atividade sobre a pectina foram identificadas nas famílias PL3 (pectato liase) e GH28 (poligalacturonase), famílias com atividade auxiliar foram AA9 (monooxygenase Cel61A) e AA3 (GMC oxidoreductase) e para atividade em amido foram as famílias GH15+CBM 20 (glucano 1,4-alfa-glicosidase) GH31 (alfa-glicosidase) e GH65 (alfa-trehalase).

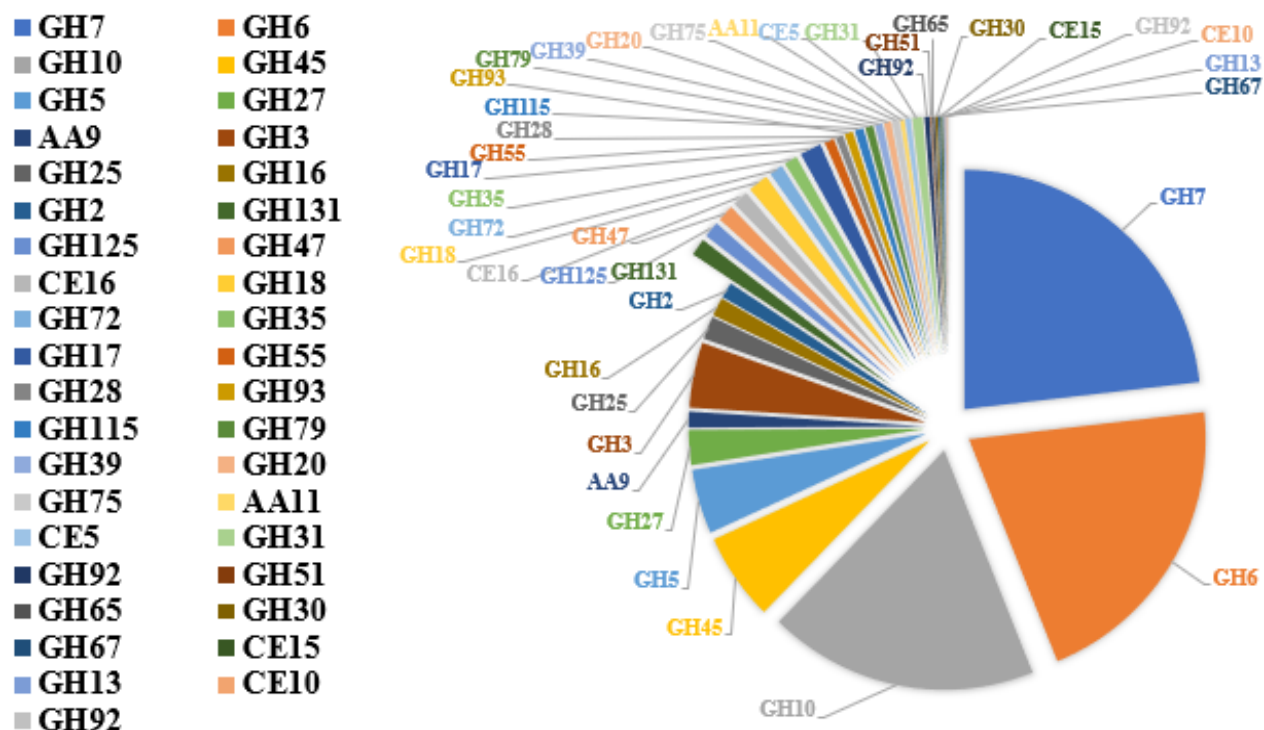
A espécie *T. aurantiacus* é considerado uma plataforma eficiente para produção de um coquetel enzimático termofílico para a sacarificação de biomassas vegetais. No entanto, a maioria dos trabalhos que descrevem o potencial enzimático do fungo *T. aurantiacus* buscam estudar a produção de extratos brutos, caracterizar individualmente as enzimas hidrolíticas, visam a produção de enzimas recombinante, analisar o conjunto de CAZymes encontrados em genomas sequenciados, e avaliar a atividade enzimática descrevendo o potencial de sacarificação de seus extratos enzimáticos (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008; DA SILVA et al., 2005; MURPHY et al., 2011; SCHUERG et al., 2017a). Apenas as hidrolases glicosídicas dominantes (GH5, GH7, GH10, GH61) presentes no secretoma de *T. aurantiacus* cultivado em *Panicum virgatum* (switchgrass) foram identificadas por análise de proteômica até o momento (MCCLENDON et al., 2012).

Assim, este trabalho foi o pioneiro nesta abordagem, pois foi o primeiro a fazer uma identificação completa do repertório enzimático secretado pelo fungo termofílico *T. aurantiacus* produzido em material lignocelulítico.

5.4.6.2 CAZymes identificadas no secretoma de *R. emersonii* COQ.

No secretoma de *R. emersonii* COQ, as 47 CAZymes foram classificadas em 39 famílias, das quais as famílias mais expressas foram GH7(23%), GH6 (21%), GH10 (18%), GH45 (6%), GH5 (4%), GH3 (4%),GH27 (2%) GH25 (2%) representam 80% das famílias expressas (Figura 14).

Figura 14. Diversidades de CAZymes identificadas no secretoma de *R. emersonii* COQ. As proteínas foram classificadas de acordo com o banco de dados CAZy. A abundância de cada família foi realizada com a contagem espectral normalizado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No secretoma de *R. emersonii* COQ, as proteínas que possuem atividade sobre a hemicelulose foram classificadas nas famílias GH10+CBM1 endo-1,4-beta-xilanase, GH27 (alfa-galactosidase), GH3 (beta-1,4 xilosidase), GH2 (beta-mannosidase), GH125 (Exo-alpha-1,6-manosidase), GH47 (mannosidase), CE16 (acetilesterase), GH35 (beta-galactosidase), GH93(exo-alfa-L-1,5-arabinanase), GH115 (alfa-1,2-glucuronidase), alfa-(4-O-metil)-glucuronidase), GH79 (beta-glucuronidase), (GH39 (alfa-L-iduronidase, beta-xylosidase), GH51 alfa-L-arabinofuranosidase, GH30 (beta-1,6-glucanase), GH67 (alfa-glucuronidase), CE10 (carboxilesterase), GH92 (alfa-1,2-mannosidase). As proteínas com atividades sobre celulose foram classificadas nas famílias GH7 (celobiohidrolase), GH6 (celobiohidrolase), GH45 (endoglucanase) GH5+ CBM46, GH3 (beta-glicosidase), GH16 (endo- β -1,3-1,4-glucanase), GH131 (Exo- β -1,3/1,6- glucanase, endo- β -1,4-glucanase), GH72 (1,3-beta-glucanosiltransferase), GH17 (beta-1,3-glicosidase), GH55 (exo-beta-1,3-glucanase).

Na desconstrução do amido, as três das famílias identificadas foram GH31 (alfa-glucosidase), GH65 (alfa-trehalase) e GH13 (alfa-amilase). Para atividades auxiliares, foi encontrada apenas a família AA9 (celulose monoxigenase Cel61). Para pectina, encontramos apenas uma família: GH28 (poligalacturonase).

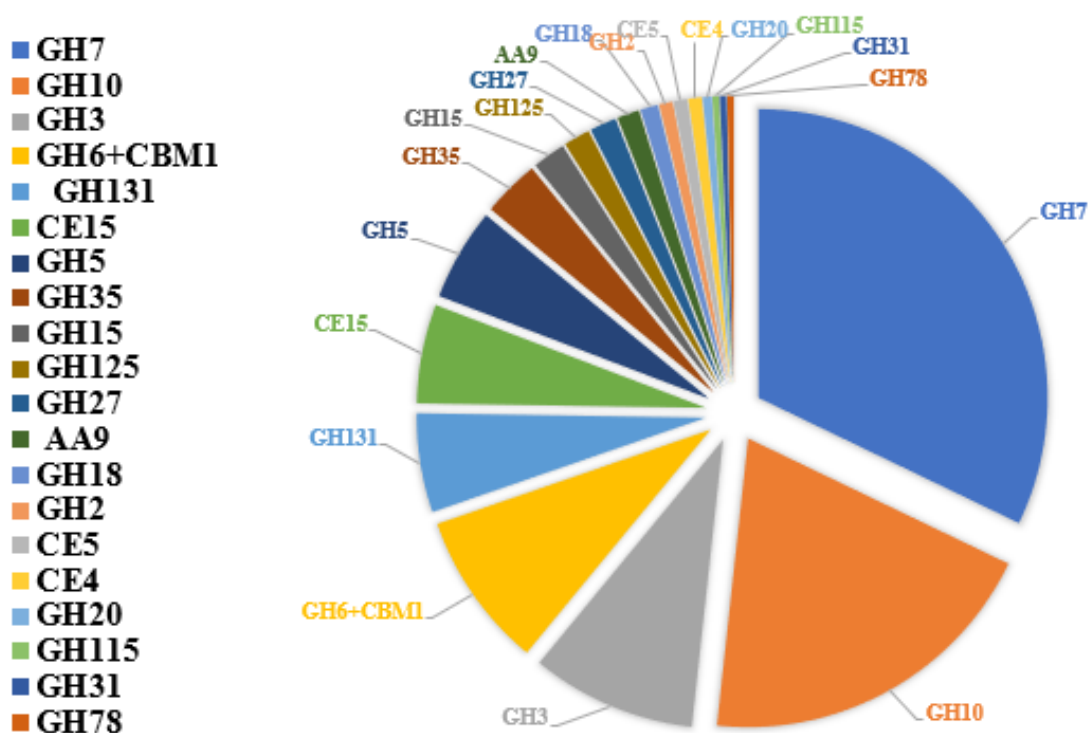
Coquetéis enzimáticos produzidos por *R. emersonii* secretam grandes quantidades de proteínas e contêm enzimas específicas com eficientes catálises e excelentes propriedades de armazenamento a longo prazo (POLIZELI et al., 2005; TUOHY; LAFHEY; COUGHLAN, 1994). No entanto, estudos do seu secretoma total induzido em material lignocelulósico, por técnicas de espectrometria de massas, são restritos até o momento. Assim como ocorre para o fungo *T. aurantiacus*, a maioria dos dados publicados sobre *R. emersonii* também são limitados a estudos de enzimas purificadas isoladas, produção de extratos brutos, caracterização de enzimas recombinantes, atividade enzimática de extratos enzimáticos, potencial de sacarificação dos coquetéis enzimáticos e estudos do conjunto de CAZymes encontrados no sequenciamento de genomas (MARTÍNEZ et al., 2016; PERKINS et al., 2015; WATERS et al., 2010).

5.4.6.3 CAZymes identificadas no secretoma de *R. composticola* FMG6.

As 34 CAZymes identificadas no secretoma de *R. composticola* FMG6 foram classificadas em 20 famílias, sendo as mais abundantemente expressas foram GH7 (32%), GH10 (20%) GH6+CBM1 (9%), GH3 (9%), GH131 (6%), CE15 (6%), GH5 (5%), GH35 (3%), e GH15 (2%), representando 92% da expressão total das famílias encontradas no secretoma (Figura 15). No secretoma de *R. composticola* FMG6, as proteínas identificadas que possuem atividade sobre a hemicelulose foram classificadas nas famílias GH10+CBM1 (endo-1,4-beta-xilanase) CE15 (glucuronil esterase), GH125 (alfa-manosidase) GH35 (beta-galactosidase), GH27 (alfa galactosidase A), GH2 (beta-mannosidase) GH3 (1,4-beta-xilosidase) GH115 (alfa-1,2-glucuronidase), GH35 (beta-galactosidase). As famílias com atividade para desconstruir o polímero de celulose foram GH7+CBM1 (celobiohidrolase), GH6+CBM1 (1,4-beta-cellobiosidase), GH3 (beta-glucosidase), GH131 (exo-beta-1,3/1,6-glucanase endo-beta-1,4-glucanase), GH5+CBM46 (endoglucanase). Em menor quantidade, a proteína encontrada com atividade sobre a pectina pertence à família GH78 (alfa- L-ramnosidase), a atividade auxiliar é representada pela família AA9 (celulose monoxigenase Cel61), e a atividade sobre

amido é representada pelas famílias GH15+CBM20 (glucano 1,4-alfa-glucosidase) e GH20 (beta-N-acetil hexosaminidase).

Figura 15. Diversidades de CAZymes identificadas no secretoma de *R. composticola* 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.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Essa foi a primeira caracterização para espécie *R. composticola* quanto a identificação de CAZymes em seu secretoma produzido em matéria lignocelulósica. Pois, apesar desse fungo termofílico estar em um gênero no qual são descritas muitas enzimas de importância industrial, até o momento não há estudos sobre a identificação das enzimas expressas em seu secretoma. Esses resultados mostram que o repertório enzimático secretado para *R. composticola* FMG6 possui enzimas-chave para uma desconstrução eficiente de materiais lignocelulósicos.

5.4.7 Panorama geral das principais CAZymes comuns identificadas nos secretomas

A grande disponibilidade de genomas sequenciados de fungos filamentosos permite a identificação de centenas de genes por espécies codificantes de CAZymes. No entanto, seria

inviável testar combinações de todas as CAZymes identificadas no genoma de cada espécie com o intuito de delinear coquetéis enzimáticos eficientes na desconstrução de biomassas vegetais. Neste cenário, a avaliação das enzimas de fungos secretadas e induzidas por lignocelulose, por métodos de alto rendimento como proteômicas, são considerados vantajosas para o desenvolvimento de efetivos repertórios enzimáticos para a sacarificação de biomassas (ADAV; CHAO; SZE, 2012; ZHAO et al., 2013).

De forma geral, os três secretomas avaliados possuem as enzimas necessárias para a desconstrução total da celulose, visto que as principais enzimas para a desconstrução desse polímero são as endo-1,4- β -glucanase, celobiohidrolases e β -glicosidases (LEE et al., 2008). Os três arsenais enzimáticos avaliados também possuem enzimas chaves para a desconstrução da hemicelulose. Para a desconstrução da hemicelulose, as principais enzimas relatadas são as endo-1,4-xilanases, β -xilosidases, endo-1,4- β -mananase e β -manosidase, além das enzimas acessórias que auxiliam a degradação de polímeros hemicelulósicos através da clivagem de resíduos da cadeia lateral. As principais enzimas acessórias são α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase, acetil xilano esterase, ácido ferúlico esterase e β -galactosidase (MANJU; SINGH CHADHA, 2011; SHALLOM; SHOHAM, 2003).

Celulases foram as enzimas mais expressas nos três secretomas analisados. Além disso, a comparação espectral de todas as CAZymes identificadas neste estudo demonstrou que as celobiohidrolases da família GH7, foram as enzimas mais expressas para os três fungos (Figura 13, 14 e 15). Alguns fungos industrialmente explorados para produção de enzimas aplicadas na sacarificação de biomassa, como *T. reesei* e *Myceliophthora thermophila*, quando induzidos por biomassa lignocelulósica, também possuem uma grande abundância de CAZymes da família GH7 em seus secretomas, sendo celobiohidrolase a classe de enzima mais expressa (BORIN et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2016). Para a desconstrução de material lignocelulósicos, as GH7 são consideradas as mais eficientes enzimas celulolíticas (BARNETT; WILKINSON; NAIDOO, 2010; YAN; LI; YAO, 2011).

Enzimas amilolíticas são compostas por três grupos de enzimas; glucoamilase, α -amilase e α -glicosidase, no qual pertencem as famílias GH31, GH15 e GH13 (CHEN et al., 2012). Os três secretomas avaliados apresentaram representantes de famílias amilolíticas, sendo *R. emersonii* COQ o secretoma com maior número de enzimas expressas.

Para a degradação da pectina, são requeridas principalmente 4 grupos de enzimas; pectina liase, pectato liase, pectina esterase e poligalacturonase (LAGAERT; BELIËN; VOLCKAERT, 2009). As poligalacturonases (GH28) e as pectina liases (PL3) foram encontradas no secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756. Os secretomas de *R. emersonii*

COQ e *R. composticola* FMG6 apresentaram apenas representantes da família GH28. A ação das pectinases, mais especificamente as poligalacturonases, permite mais facilmente o acesso da celulose pelas celulasas, devido a um “afrouxamento” da parede celular (MOHAMED et al., 2006).

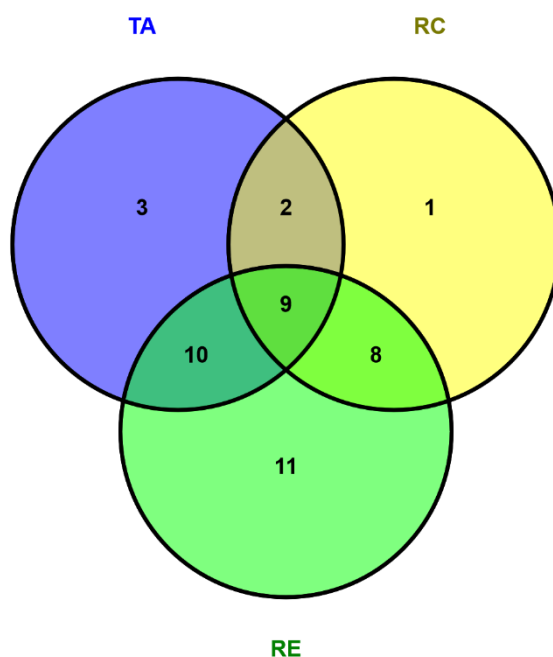
Para a desconstrução da lignina, as principais enzimas relatadas são as lacases, lignina peroxidases e manganês peroxidases (BLANCHETTE et al., 1997). No entanto, as enzimas geradoras de radicais reativos e oxidases (não hidrolases) também podem fazer parte do processo de despolimerização da lignina (ANDER; MARZULLO, 1997). Em nenhum dos secretomas avaliados nesse estudo foram encontradas enzimas com atividade diretamente sobre a lignina. No entanto foram reportadas no secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. emersonii* COQ enzimas redutases, e no secretoma de *R. composticola* FMG6 catalases.

Enzimas auxiliares atuam nos processos oxidativos dos polissacarídeos e na lignina de forma indireta e direta. Essas enzimas fazem parte do grupo das enzimas auxiliares as LPMOs (AA9, AA10, AA11 e AA13). As celobiose desidrogenases (CDHs) atuam como doadoras de elétrons para LPMOs e outras oxidases, as quais estão agrupadas na família AA3. As enzimas ligninolíticas desta classe encontram-se nas famílias AA1, AA2, AA4, AA6, AA8 e AA12 (LEVASSEUR et al., 2013; WESTERENG et al., 2015). Nossos resultados para os três secretomas avaliados encontraram enzimas pertencentes à classe de enzimas auxiliares, sendo a família AA9 comum para os três secretomas. Em *T. aurantiacus* CBMAI 756 foram identificadas as famílias AA3 e AA9, no secretoma do fungo *R. composticola* FMG6 apenas AA9 e no secretoma de *R. emersonii* COQ AA9 e AA11.

As LPMO destacam-se por sua importância na utilização da lignocelulose pelos fungos decompositores. Sabe-se que sua atuação sinérgica com a família AA3, é relacionada a uma maior degradação da celulose (MORGENSTERN; POWLOWSKI; TSANG, 2014; PHILLIPS et al., 2011). A família de AA9 foi a classe de enzimas oxidativas mais secretadas e detectada nos secretomas estudados por este estudo. Dos secretomas avaliados neste trabalho, apenas o do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756 apresentou a combinação de AA3 e AA9 o que pode favorecer a sacarificação da celulose por este fungo.

As famílias GH7, GH5, GH10, GH3, CE15, AA9, GH27, GH18 e GH35 foram compartilhadas de forma comum pelos três secretomas avaliados (Figura 16). A família GH18, no qual é composta por enzimas denominadas quitinases que podem conter funções relacionadas a degradação da parede celular do fungo (quitosanase, β -N-acetil-hexosaminidase e lisofosfolipase), podendo ser induzidas pelo mesmo mecanismo de outras CAZymes (SCHNEIDER et al., 2016).

Figura 16. Diagrama de Venn para as CAZymes encontradas no secretoma dos fungos *T. aurantiacus* CBMAI 756 (TA) *R. composticola* FMG6 (RC) e *R. emersonii* COQ (RE). O diagrama de Venn mostra a quantidade de CAZymes compartilhadas e exclusivas pelos respectivos secretomas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os números representados na correspondem as respectivas CAZymes: 1 GH78 – 2 CE4 e GH15 – 3 CE1, PL3 e AA3 – 8 GH6, GH131, GH125, GH2, CE5, GH20, GH115 e GH31 – 9 GH7, GH5, GH10, GH3, CE15, AA9, GH27, GH18 e GH35 – 10 GH67, GH17, GH25, CE16, GH79, GH51, GH65, GH16, GH28 e GH47 – 11 GH45, GH72, GH55, GH93, GH39, GH75, AA11, GH92, GH30, GH13 e CE10.

Borin et al., 2015 relataram encontrar as famílias GH5, GH7, GH3 e AA9 em secretomas de fungos cultivados em bagaço de cana-de-açúcar, comumente utilizados na indústria como *T. reesei* e *Aspergillus niger*. As enzimas com representantes nas famílias GH10, GH3 e GH27 também desempenham grande importância para a desconstrução da hemicelulose. Essas enzimas possuem uma grande distribuição no genoma de fungos filamentosos como relatado por Zhao et al. (2013).

As famílias CE1, AA3, PL3 foram identificadas exclusivamente para o secretoma do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756, enquanto apenas GH78 (α -L-rhamnosidase) foi identificada somente no secretoma de *R. composticola* FMG6. No secretoma de *R. emersonii* COQ foram

identificadas exclusivamente as famílias GH45, GH72, GH93, GH39, GH75, AA11, GH92, GH30, GH13 e CE10 (Figura 16).

Esses resultados demonstram que os três fungos termofílicos avaliados neste trabalho destacaram-se por importantes atividades enzimáticas em fermentação submersa, possuem estratégias alternativas para a desconstrução do mesma fonte de carbono altamente complexa utilizada neste trabalho. Com isso, nosso estudo permitiu caracterizar o secretoma de espécie fúngicas promissoras na produção de enzimas termofílicas, mostrando a expressão e a composição de enzimas chaves produzidas em material lignocelulósico. Com o conhecimento global de todas as enzimas expressas e suas proporções, a construção de misturas enzimáticas efetivas para uma sacarificação mais eficiente pode ser mais facilmente direcionada. Ressalta-se ainda que *R. composticola* é um potencial produtor de CAZymes, podendo ser utilizado em estudos posteriores para produção de coquetéis fúngicos termofílicos aplicados na bioconversão de biomassas vegetais. Além disso, por ser uma nova e potencial plataforma de enzimas termofílicas para aplicações em bioprocessos industriais, o fungo *R. composticola* é um excelente candidato para estudos futuros como sequenciamento de genoma e caracterização de enzimas individuais.

5.5. CONCLUSÕES

Este trabalho selecionou e identificou novas cepas termofílicas produtoras de potenciais coquetéis enzimáticos para a sacarificação de biomassas vegetais.

Foram realizadas as primeiras caracterizações e análises comparativas de secretomas na desconstrução biomassas vegetais de espécies fúngicas termofílicas importantes; como *T. aurantiacus* e *R. emersonii*, além de *R. composticola*, um novo potencial coquetel fúngico termofílico. As três secretomas foram detentores de repertórios completos de CAZymes que foram induzidas com resíduos lignocelulósicas.

As três espécies analisadas produzem importantes enzimas que podem ser estudadas e utilizadas em processos industriais como a degradação de polissacarídeos complexos. Estes resultados foram importantes por ampliar o conhecimento das estratégias utilizadas pelas espécies fúngicas *T. aurantiacus* e *R. emersonii* assim como *R. composticola* na degradação de materiais lignocelulósicos.

5.6. ANEXOS

Tabela 3. Enzimas secretadas por *T. aurantiacus* 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 *T. aurantiacus* v1.0, depositado no JGI.

Gene ID	Classificação	Predição dbCAN/ HMMER	MW	Secreção	Spectrum count			Atuação/ função
41785	GH7	Celobiohidrolase	49 kDa	Sim	406	455	471	Celulose
65156	GH5	Endoglucanase	37 kDa	Sim	242	474	481	Celulose
1236	GH10	endo-1,4-beta-xilanase	35 kDa	Sim	209	240	160	hemicelulose
64461	GH3	beta-xilosidase	87 kDa	Sim	84	162	113	hemicelulose
34576	GH3	beta-glucosidase	93 kDa	Sim	72	58	121	Celulose
36875	GH67	alfa-glucuronidase	92 kDa	Sim	44	22	80	hemicelase
48254	GH17	exo-beta-1,3-glucanase	59 kDa	Sim	28	22	53	Celulose
50781	CE4	polissacarídeo deacetilase	25 kDa	Sim	26	38	52	Quitinase
64186	GH15+CBM20	glucano 1,4-alfa-glucosidase	66 kDa	Sim	13	19	21	amido
51221	CE16	acetil xilano esterase	41 kDa	Sim	4	21	20	hemicelulose
47534	CE15	glucuronoil esterase	46 kDa	Sim	10	19	20	hemicelulose
34483	CE1	Carboxil esterase (cooesterase), tipo B	56 kDa	Sim	13	19	13	hemicelulose
49547	PL3	pectina liase	86 kDa	Sim	14	4	21	pectinases
45020	GH79	beta-glucuronidase	57 kDa	Sim	15	7	16	hemicelulose
43287	GH51	alfa-L-Arabinofuranosidase	68 kDa	Sim	13	7	12	hemicelulose
7903	GH65	alfa-trealase	119 kDa	Sim	10	4	15	Amido
63392	AA3	GMC oxidoreductase	72 kDa	Sim	14	3	13	oxidoreductas e/degradação de lignina
2621	GH17	exo-beta-1,3-glucanase	33 kDa	Sim	3	6	5	Celulose
3070	AA9	celulose monooxygenase Cel 61A	26 kDa	Sim	7	12	5	oxidoreductas e/degradação de lignina
42553	PL3	pectina liase	87 kDa	Sim	2	4	4	Pectinases
47440	GH27	alfa-galactosidase	52 kDa	Sim	2	9	5	hemicelulose
63655	GH16	Endo-1,3(4)-beta-glucanase	36 kDa	Sim	6	9	5	Pectinases
45153	GH28	Poligalacturonase	38 kDa	Sim	1	5	3	pectinase
41770	GH18	Quitinase	47 kDa	Sim	1	7	5	Quitinase
44572	GH5	Endoglucanase	47 kDa	Sim	0	8	2	Celulose
40837	GH31	alfa-glicosidase	205 Kda	Sim	5	11	0	Amido
40415	GH47	alfa-mannosidase	57 kDa	Sim	0	3	1	hemicelulose
61978	GH35	beta-galactosidase	111 kDa	Sim	2	6	1	hemicelulos e
46241	GH25	peptidoglicano hidrolases	25 kDa	Sim	0	0	4	Lisozime
56448	GH28	Poligalacturonases	48 kDa	Sim	2	5	0	Pectinase
22148	PI-PLC-X	Fosfolipase específica ao fosfatidilinositol, domínio C, X.	63 kDa	Sim	1	0	2	Outras
39627	CP	Cerato-platanina	15 kDa	Não	5	1	2	Outras
41417	NPP1	Proteína indutora de necrose (NPP1)	29 kDa	Não	0	5	5	Outras
53517	Asp	Protease aspartilótica eucariótica	43 kDa	Sim	9	16	4	Protease
57314	Peptidase_S10	Carboxipeptidase de serina	62 kDa	Sim	5	22	16	Protease

60765	Asp	Protease aspartilótica eucariótica	43 kDa	Sim	0	5	4	Protesase
21519	Tiorredoxina	Tiorredoxina	11 kDa	Sim	3	4	0	oxirreductases
61899	Ribonuclease_T2	Ribonuclease família T2	28 kDa	Não	3	3	1	Outras
62136	Peptidase_M35		37 kDa	Sim	2	3	4	Protease
7869	S8	Peptidase S8	67 kDa	Sim	2	8	1	Protease
964	GPI- ancorada	proteína da organização da parede celular	41 kDa	Não	1	7	6	Outras
65155	Lipase	Lipase	32 kDa	Sim	5	0	2	Lipase

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4. Perfil do enzimas secretadas por *R. emersonii* 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 *R. emersonii* CBS 393.64, depositado no NCBI.

Gene ID	Classificação	Predição dbCAN/HMMER	MW (kDa)	Secreção	Spectrum count			Atuação/ função
XP_013327603.1	GH7	Celobiohidrolase	49 kDa	Sim	323	439	379	celulose
XP_013330424.1	GH6	celulose 1,4-beta-celobiohidrolase	48 kDa	Sim	347	368	362	celulose
XP_013330999.1	GH10+CBM1	endo-1,4-beta-xilanase	44 kDa	Sim	312	369	276	hemicelulose
XP_013329502.1	GH45	endoglucanase	23 kDa	Sim	120	94	94	celulose
XP_013323622.1	GH5+CBM46	endoglucanase	68 kDa	Sim	69	35	50	celulose
XP_013326293.1	GH5	endoglucanase	37 kDa	Sim	26	23	23	celulose
XP_013331263.1	GH27	alfa-galactosidase	49 kDa	Sim	37	44	41	hemicelulose
XP_013325186.1	AA9	celulose monooxygenase Cel61	27 kDa	Sim	21	17	17	atividade auxiliar
XP_013330184.1	GH3	beta-glucosidase	93 kDa	Sim	46	0	50	celulose
XP_013322835.1	GH3	1,4-beta-xilosidase	87 kDa	Sim	56	4	30	hemicelulose
XP_013331851.1	GH25	N, O-diacetil muramidase	24 kDa	Sim	37	32	11	lisozima
XP_013328908.1	GH7	Celobiohidrolase	44 kDa	Sim	12	29	24	celulose
XP_013329840.1	GH16	endo-β-1,3-1,4-glucanase	42 kDa	Sim	19	27	19	celulose
XP_013327521.1	GH2	Beta-mannosidase	105 kDa	Sim	23	0	32	hemicelulose
XP_013331469.1	GH131	Exo-β-1,3/1,6-glucanase, endo-β-1,4-glucanase	29 kDa	Sim	20	23	18	celulose
XP_013326343.1	GH125	Exo-α-1,6-mannosidase	57 kDa	Sim	9	26	22	hemicelulose
XP_013330839.1	GH47	Manosidase	56 kDa	Sim	11	28	19	hemicelulose
XP_013325098.1	CE16	Acetilesterase	39 kDa	Sim	14	24	17	hemicelulose
XP_013328606.1	GH18	quitinase	48 kDa	Sim	1	35	16	quitina
XP_013325171.1	GH72	1,3-beta-glucanosiltransferase	49 kDa	Sim	20	18	10	celulose
XP_013330816.1	GH35	Beta-galactosidase	110 kDa	Sim	27	0	19	hemicelulose
XP_013329317.1	GH17	Glucano-1,3-beta-glucosidase	32 kDa	Sim	15	16	11	celulose
XP_013326604.1	GH55	Exo-beta-1,3-glucanase	86 kDa	Sim	17	0	17	celulose
XP_013331547.1	GH28	Poligalacturonase	39 kDa	Sim	14	11	0	pectinase

XP_01332799 2.1	GH93	Exo-alfa-L-1,5- arabinanase	42 kDa	Sim	13	12	4	hemicelulose
XP_01332546 6.1	GH115	xilano alfa-1,2- glucuronidase, alfa-(4-O- metil)- glucuronidase	111 kDa	Sim	20	0	10	hemicelulose
XP_01332650 8.1	GH79	beta- glucuronidase	58 kDa	Sim	14	0	13	hemicelulose
XP_01332422 7.1	GH39	alfa-L-iduronidase, beta-xilosidase	52 kDa	Sim	7	11	7	hemicelulose
XP_01332571 6.1	GH20	beta-N-acetil- hexosaminidase	67 kDa	Sim	5	9	10	quitina
XP_0133246 4.1	GH3	1,4-beta- xilosidase	82 kDa	Sim	13	0	10	hemicelulose
XP_01332318 3.1	GH18	quitinase	38 kDa	Sim	10	6	3	quitina
XP_01332878 4.1	GH16	beta-glucanase	61 kDa	Sim	8	7	6	celulose
XP_01332805 1.1	GH3	beta-glucosidase	86 kDa	Sim	13	0	7	celulose
XP_01332515 1.1	GH75	Quitosanase	27 kDa	Sim	10	7	4	quitosanase
XP_0133254 72.1	AA11	quitina polissacarídeo lítico monooxigenase	24 kDa	Sim	1	7	6	atividade auxiliar
XP_01332330 7.1	CE5	quitinase	92 kDa	Sim	0	8	9	quitina
XP_01332915 3.1	GH31	alfa-glucosidase	108 kDa	Sim	12	0	6	amido
XP_0133212 2.1	GH92	alfa-manosidase	89 kDa	Sim	5	0	12	hemicelulose
XP_01332677 7.1	GH31	alfa- glucosidase,	82 kDa	Sim	11	0	6	amido
XP_01332591 7.1	GH51	afa-L- arabinofuranosidase	84 kDa	Sim	3	0	1	hemicelose
XP_01333192 8.1	GH65	alfa-trealase	116 kDa	Sim	7	0	3	amido
XP_01332342 9.1	GH30	beta-1,6- glucanase	52 kDa	Sim	0	4	3	celulose
XP_01332508 9.1	GH67	alfa- glucuronidase	91 kDa	Sim	3	0	4	hemicelulose
XP_01332879 7.1	CE15	Glucuronil esterase	43 kDa	Sim	0	3	4	hemicelulose
XP_01332934 0.1	GH13	alfa-amilase	56 kDa	Sim	0	3	3	amido
XP_01332307 0.1	CE10	Carboxilesterase	60 kDa	Sim	0	5	0	hemicelulose
XP_01332366 6.1	GH92	alfa-1,2- manosidase	92 kDa	Sim	1	0	3	hemicelulose
XP_01333041 2.1	HsbA	Proteína de ligação superficial hidrofóbica A	29 kDa	Sim	39	52	51	proteína de ligação
XP_01332569 8.1	-	proteína hipotética	76 kDa	Sim	28	2	32	proteína hipotética
XP_01332448 2.1	HsbA	Proteína de ligação superficial hidrofóbica A	18 kDa	Sim	5	12	9	proteína de ligação
XP_01333040 9.1	-	proteína hipotética	27 kDa	Sim	4	10	7	Proteína hipotética
XP_01333035 9.1	Asp	Protease de aspartato	41 kDa	Sim	10	8	1	protease/ peptidase

XP_01332510 2.1	-	proteína hipotética	74 kDa	Sim	8	0	11	proteína hipotética
XP_01332789 8.1	Peptidase_S10	serina carboxipeptidase	59 kDa	Sim	0	2	16	protease/ peptidase
XP_01332543 0.1	-	proteína hipotética	16 kDa	Sim	8	6	4	proteína hipotética
XP_01333035 8.1	S1/P1 Nuclease	S1/P1 Nuclease	31 kDa	Não	7	4	6	Nuclease
XP_01333089 9.1	-	proteína hipotética	63 kDa	Sim	8	0	6	proteína hipotética
XP_01333210 0.1	-	proteína hipotética	80 kDa	Sim	7	0	7	proteína hipotética
XP_01332317 7.1	HsbA	Proteína de ligação superficial hidrofóbica A	18 kDa	Sim	0	3	2	proteína de ligação
XP_01332821 2.1	Asp	Protease aspártico	46 kDa	Sim	3	2	6	protease/ peptidase
XP_01333008 7.1	proteína hipotética	proteína hipotética	19 kDa	Sim	2	3	5	proteína hipotética
XP_01332510 0.1	Asp	Asp f 15 Precursor	15 kDa	Sim	0	3	1	protease/ peptidase
XP_01333136 9.1	ceramidase	Ceramidase não lisossomal neutra / alcalina	82 kDa	Sim	0	0	4	ceramidase
XP_01332448 8.1	RNase T2	Família de ribonuclease T2	30 kDa	Não	2	2	1	RNase T2
XP_01332908 6.1	Peptidase S8	peptidase família S8	64 kDa	Sim	0	3	1	protease/ peptidase
XP_01333019 9.1	Aldose epimerase	aldose 1- epimerase	44 kDa	Sim	0	0	4	aldose 1- epimerase
XP_01332357 7.1	lipase	lipase	31 kDa	Sim	24	24	16	lipase
XP_01332965 5.1	Tiorredoxina redutase (TrxRs)	oxidoreduases de nucleído- dissulfureto de piridina	44 kDa	Sim	1	15	15	Oxirredutase

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5. Enzimas secretadas por *R. composticola* 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 banco de proteínas.

Gene ID	Classificação	Predição dbCAN/ HMMER	Organismo	MW (kDa)	Secreção	Spectrum count			Atuação/ função
KKA20991 .1	GH7	celobiohidrolase	<i>R. emersonii</i>	49 kDa	Sim	58	69	65	celulose
KKA24387 .1	GH10+ CBM1	endo-1,4-beta-xilanase	<i>R. emersonii</i>	44 kDa	Sim	39	49	39	hemicelulose
KKA23812 .1	GH6+CBM1	1,4-beta-celobiohidrolase	<i>R. emersonii</i>	48 kDa	Sim	42	12	17	celulose
GAM3334 7.1	GH7+CBM1	celobiohidrolase I Cel7A	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>	55 kDa	Sim	22	23	24	celulose
KKA23572 .1	GH3	beta-glucosidase	<i>R. emersonii</i>	92 kDa	Sim	11	20	17	celulose
KKA24857 .1	GH131	exo-beta-1,3/1,6-glucanase endo-beta-1,4-glucanase	<i>R. emersonii</i>	29 kDa	Sim	13	15	17	celulose
KKA22185 .1	CE15	glucuronil esterase	<i>R. emersonii</i>	43 kDa	Sim	9	13	13	hemicelulose
GAM8404 1.1	GH10	endo-1,4-beta-xilanase	<i>fungus sp.</i> No.11243	40 kDa	Sim	9	9	9	hemicelulose
KKA17010 .1	GH5+CBM46	Endoglucanase	<i>R. emersonii</i>	68 kDa	Sim	8	8	8	celulose
KKA24204 .1	GH35	beta-galactosidase	<i>R. emersonii</i>	110 kDa	Sim	13	4	6	hemicelulase
KKA19731 .1	GH125	metal-independent alfa-mannosidase	<i>R. emersonii</i>	57 kDa	Sim	5	2	5	hemicelulose
p A7XZT2. 1	GH27	alfa galactosidase A	<i>fungus sp.</i>	49 kDa	Sim	8	0	4	hemicelulose
KKA21439 .1	GH3	beta-glucosidase	<i>R. emersonii</i>	86 kDa	Sim	1	5	5	celulose
EPS25762. 1	AA9	celulose monooxygenase Cel61	<i>Penicillium oxalicum</i>	39 kDa	Sim	3	4	3	lignina/oxidoreductases
KKA16223 .1	GH3	1,4-beta-xilosidase	<i>R. emersonii</i>	87 kDa	Sim	5	1	2	hemicelulose
AAL33639 .2	GH5	endo-beta 1,4-glucanase	<i>R. emersonii</i>	36 kDa	Sim	2	3	4	celulose
PNS19619. 1	GH5	celulase glicosil hidrolase	<i>Sphaceloma murrayae</i>	38 kDa	Sim	4	2	3	celulose
CAP99783. 1	CE15	4-O-metil-glucuronil methyl esterase	<i>Penicillium rubens wisconsin</i>	42 kDa	Sim	2	3	2	hemicelulose
KKA20909 .1	GH2	beta-mannosidase	<i>R. emersonii</i>	105 kDa	Sim	1	3	2	hemicelulose
KKA16695 .1	CE5	quitinase	<i>R. emersonii</i>	92 kDa	Sim	0	2	4	cutinase
KKA22540 .1	GH15+CBM2 0	glucano 1,4-alfa-glucosidase	<i>R. emersonii</i>	65 kDa	Sim	2	1	2	Amido
KXX74249 .1	GH10	endo-1,4-beta-xilanase	<i>Madurella mycetomatis</i>	42 kDa	Sim	1	2	2	hemicelulose
CRG86065 .1	GH18	Quitinase	<i>Talaromyces islandicus</i>	47 kDa	Sim	2	1	2	quitina

KKA19308 .1	GH3	beta-glucosidase	<i>R. emersonii</i>	86 kDa	Sim	1	1	2	celulose
EGD99101 .1	GH20	beta-N-Acetil- hexosaminidase	<i>Trichophyton tonsurans</i>	71 kDa	Sim	2	0	2	Amido
ETN36292. 1	GH3	beta-glucosidase	<i>Cyphellophora europaea</i>	86 kDa	Sim	1	1	1	celulose
KKA18854 .1	GH115	alfa-1,2- glucuronidase, alfa-(4-O-metil)- glucuronidase		111 kDa	Sim	1	2	0	hemicelulose
EEU35859. 1	GH35	beta- galactosidase; exo-beta- glucosaminidase; exo-beta-1,4- galactanase	<i>Nectria haematococca</i>	111 kDa	Sim	1	1	1	hemicelulose
KKA23249 .1	GH18	quitinase	<i>R. emersonii</i>	36 kDa	Sim	0	2	1	quitina
KKA21377 .1	CE4	amidase	<i>R. emersonii</i>	60 kDa	Sim	0	1	2	amidase
KKA22541 .1	GH31	alfa-glucosidase	<i>R. emersonii</i>	108 kDa	Sim	1	1	1	Amido
CCA74892 .1	CE15	4-O-metil- glucuronol metil lesterase	<i>Serendipita indica</i>	49 kDa	Sim	2	1	0	hemicelulose
OAX85033 .1	CE4	amidase	<i>Helicocarpus griseus</i>	59 kDa	Sim	1	1	1	amidase
KKA23781 .1	GH78	alfa-L- ramnosidase	<i>R. emersonii</i>	73 kDa	Sim	1	1	1	pectinase
KKA23800 .1	HsbA	proteína de ligação superficial hidrofóbica A	<i>R. emersonii</i>	29 kDa	Sim	7	6	6	proteína de ligação
KKA22186 .1		catalase	<i>R. emersonii</i>	81 kDa	Sim	2	17	11	oxirredutase
GAT43684 .1	Peptidase_S10	Carboxipeptidas es de serina	<i>Mycena chlorophos</i>	90 kDa	Sim	1	1	2	protease Peptidase
KKA21286 .1	Peptidase_S10	Carboxipeptidas es de serina	<i>R. emersonii</i>	59 kDa	Sim	1	1	1	protease Peptidase
EFQ88449. 1	Peptidase_S8	Carboxipeptidas es de serina	<i>Pyrenophora terres</i>	65 kDa	Sim	1	1	2	protease Peptidase
CAP91804. 1	proteína hipotética	Proteína hipotética	<i>Penicillium rubens Wisconsin</i>	42 kDa	Sim	1	4	3	proteína hipotética
EGP92661. 1	ceramidase	Ceramidase	<i>Zymoseptoria tritici</i>	81 kDa	Sim	1	1	1	ceramidase
KKA23746 .1	S1- P1_nuclease	nuclease	<i>R. emersonii</i>	31 kDa	Sim	0	1	2	nuclease

Fonte: Elaborado pelo autor.

CAPÍTULO 3

Avaliação comparativa do potencial de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar utilizando misturas de coquetéis enzimáticos termofílicos de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Rasamsonia compositicola* FMG6 e *Rasamsonia emersonii* COQ.

6.1. RESUMO

Os fungos termofílicos têm recebido atenção significativa nos últimos anos por serem fontes de novas enzimas termoestáveis as quais são úteis em diversas aplicações biotecnológicas, principalmente na produção de biocombustíveis. Muitos estudos utilizando metodologias de suplementação, complementação, co-cultivo de fungos ou misturas de coquetéis fúngicos, vêm sendo realizados com relativo sucesso e podem proporcionar um maior rendimento de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Neste cenário o objetivo deste trabalho foi avaliar e combinar extratos enzimáticos para a desconstrução de materiais lignocelulósicos, com a finalidade de melhorar a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Os extratos enzimáticos utilizados foram os produzidos pelas espécies fúngicas termofílicas *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. emersonii* COQ, assim como *R. composticola* FMG6, detentor de um extrato enzimático até o momento sem relatos de aplicação biotecnológica. Esses extratos foram produzidos em material lignocelulósicos altamente complexo composto de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, farelo de trigo e palha de milho, durante a fermentação submersa. Inicialmente os extratos dos três fungos foram e avaliados de forma combinada e isolada para a sacarificação do bagaço-de-cana *in natura*. O extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 ao ser combinado com os extratos de *R. emersonii* COQ, *R. composticola* FMG6 e CELLIC® CTec2 proporcionou maior liberação de açúcar na sacarificação, demonstrando o grande potencial de suas enzimas em melhorar o rendimento de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Eficientes coquetéis enzimáticos foram obtidos pelas combinações dos extratos de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6, bem como a combinação de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e CELLIC® CTec2. As combinações liberaram maiores concentrações de glicose e xilose que o coquetel comercial isolado CELLIC® CTec2, nos três tipos de bagaço de cana-de-açúcar avaliados. Além disso, a aplicação do extrato enzimático de *R. composticola* FMG6 apresentou um portfólio diversificado de enzimas tão promissor quanto o potencial coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756, apresentando atividades celulolíticas, hemicelulolíticas e de enzimas acessórias importantes para a etapa de sacarificação da biomassa.

Palavras-chave: *Rasamsonia composticola* FMG6, *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, sacarificação, bagaço de cana-de-açúcar, enzimas termofílicas

6.2. INTRODUÇÃO

Um dos principais gargalos na produção de etanol de segunda geração (E2G) é a obtenção de açúcares fermentescíveis de materiais lignocelulósicos para a fermentação. A conversão da biomassa lignocelulósica é realizada por um complexo de enzimas atuantes em sinergia na desconstrução dos polissacarídeos. Para que a utilização dos açúcares da biomassa residual vegetal seja economicamente viável, é necessário haver não somente melhorias na taxa de conversão de sacarificação do polissacarídeos, como também a redução do custo envolvidos com cargas enzimática (ALVIRA; NEGRO; BALLESTEROS, 2011; BERLIN et al., 2007; GAO et al., 2011; HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Os coquetéis enzimáticos disponíveis atualmente para hidrólise enzimática são na grande maioria atuantes a 50 °C. No entanto, estes coquetéis exibem baixos rendimentos na liberação de açúcares, longos períodos de reações, necessidade de altas doses de carga enzimática, além de apresentar propensão a contaminação microbiana. Como alternativa para a superação dessas limitações, a utilização de coquetéis enzimáticos termofílicos é uma promissora alternativa (MCCLENDON et al., 2012; VIIKARI et al., 2007; YEOMAN et al., 2010). As enzimas termoestáveis são consideradas vantajosas por possuírem estabilidade durante as condições adversas do processo de sacarificação, possuindo altas taxas catalíticas que reduzem potencialmente o tempo de processo, economizando energia e melhorando os rendimentos de hidrólise (KARNAOURI et al., 2016). Neste contexto, os fungos termofílicos se destacam como fonte de enzimas termoestáveis por possuir a capacidade de secretar altas concentrações de enzimas que atuam em temperaturas elevadas (MORETTI et al., 2012; SALAR; ANEJA, 2007; SCHUERG et al., 2017a).

Na natureza, nenhum micro-organismo atua sozinho na decomposição de resíduos lignocelulósicos, pois não secretam todas as enzimas necessárias em quantidades adequadas para uma completa desconstrução da biomassa. Com isso, combinações de diferentes extratos fúngicos de diferentes espécies são indicadas para obtenção de uma maior eficiência na sacarificação de resíduos lignocelulósicos (BORIN et al., 2015; DUTRA et al., 2017; VISSER et al., 2015).

Desse modo, misturas de enzimas de diferentes fontes geralmente levam a um incremento na taxa de sacarificação, principalmente em bagaço de cana-de-açúcar biomassa de alta recalcitrância (ARIAS et al., 2016). Por exemplo, Braga et al., (2014) observaram aumentou a conversão de 36% de celulose de cana-de-açúcar pré-tratada em glicose após o

tratamento com o coquetel comercial Celluclast 15L com adição do extrato de *Aspergillus oryzae* P21C3.

Nesse contexto, a alta diversidade de enzimas produzidas pela maioria dos fungos é uma promissora contribuição para a produção de coquetel industriais mais eficientes e menos onerosos (REYES-SOSA et al., 2017). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o potencial de extratos enzimáticos isolados e combinados produzidos por fermentação submersa de fungos termofílicos *T. aurantiacus* CBMAI 756 *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6, frente a sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Produção de extratos enzimáticos.

Os extratos dos fungos *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ (cepas de maior produção enzimática) nas mesmas condições em que foram caracterizados no capítulo 2, foram produzidos por fermentação submersa para as avaliações da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, isoladamente e em combinações. Para isso, 10^5 esporos por mL, produzidos em meio PDA foram inoculados em um meio contendo 2% (w/v) de uma mistura de palha de milho, farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, todos *in natura* em uma solução de sais contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,5 g/L); KH_2PO_4 (3,0 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L); CaCl_2 (0,5 g/L), Tween 80 (10,0 mL) e 2% (w/v), com pH ajustado para 5,0. Os meios foram incubados a 50 °C para *T. aurantiacus* CBMAI 756, a 28 °C para *Trichoderma reesei* RUT C30 e a 55°C para *R. composticola* FMG6 e *R. emersonii* COQ por 240 horas a 100 rpm.

Após a produção dos extratos, a concentração total de proteínas solúveis foi determinada conforme o fabricante pelo kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). A atividade enzimática *filter paper activity* (FPase) foi realizada pela metodologia de Ghose (1987). Uma unidade (FPU) de FPase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto. A cepa de *T.reesei* RUT C30 foi utilizada como controle da produção de FPU e proteínas totais dos coquetéis.

6.3.2. Hidrólise enzimática (ESTÁGIO 1)

Os ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar com os extratos enzimáticos das cepas *R. emersonii* COQ, *R. composticola* FMG6, e a cepa de *T. aurantiacus* CBMAI 756 foram realizados em estágios distintos, denominados de ESTÁGIO 1 e ESTÁGIO 2.

Os ensaios de hidrólise enzimática no ESTÁGIO 1 foram realizados em triplicata e ocorreram em reações tamponadas (citrate 4.8 0,5 M) com volume final de 1 mL, em microtubos de 2 mL com teor de sólidos de 5 % (m/v), representando 50 mg de biomassa. A dosagem de cada extrato foi realizada pela atividade de FPase. Cada ensaio recebeu 0,4 FPU, totalizando 8 FPU por grama de massa seca de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Nos ensaios com combinações de extratos enzimáticos, o valor total de FPU também não ultrapassou 0,4 FPU em cada reação (8 FPU/g). Esses valores de FPU, foram os máximos que comportavam o microensaio

As amostras foram incubadas em termomisturador (Eppendorf®) com agitação de 1000 x g, em 24 horas de reação, na temperatura de 60 °C para as cepas termofílicas e a 50 °C para o coquetel comercial CELLIC® CTec2 com também 0,4 FPU em cada reação. Ao final da hidrólise, as reações foram centrifugadas 14.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Então, o sobrenadante foi coletado para determinar a concentração de açúcares redutores totais pelo método do DNS (Miller, 1959).

6.3.3. Otimização das condições de sacarificação dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6

Para o novo coquetel enzimático selecionado no item anterior, composto pela combinação de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6, variadas condições de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foram testadas para a otimização das condições de atuação. Para isto, foram realizadas sacarificações dos coquetéis individuais e em combinação selecionada. A condição que melhor favoreceu a liberação de açúcares redutores foi a utilizada para os testes em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Esses ensaios foram realizados em microrreações conforme a metodologia de hidrólise em ESTAGIO 1.

Para isso, o coquetel enzimático composto por 50% (0,2 FPU) do extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 mais 50% (0,2 FPU) do extrato de *R. composticola* FMG6 e seus respectivos coquetéis individuais, foram avaliados no intervalo de temperatura de 30 a 90 °C. Para a caracterização do pH ótimo, foram utilizados os seguintes tampões: ácido cítrico/citrato de sódio 0,1 M (pH 3, 4,0, 4,8, 5 e 6), fosfato monobásico/fosfato dibásico 0,1 M (pH 7,0 – 8,0), e glicina/NaOH 0,1 M (pH 9). A temperatura para a caracterização do pH foi a 60 °C, temperatura esta usada nos *screenings* que avaliaram a sinergia e as atividades dos extratos enzimáticos termofílicos.

6.3.4. Sacarificação enzimática (ESTÁGIO 2)

Neste ensaio, os extratos enzimáticos obtidos foram concentrados 20 vezes com o concentrador tangencial com uma membrana de 10 kDa. Para este tipo de sacarificação, além do bagaço *in natura*, foram utilizados os bagaços de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos como o BD (pré-tratamento alcalino) e *Slurry* (pré-tratamento hidrotérmico sem separação de licor)

Os ensaios de hidrólise enzimática (ESTÁGIO 2) em volume de 50 mL, foram realizados com a carga enzimática total de 8 FPU/g de massa seca de bagaço, em frascos de vidro tipo *schott* de 100 mL, com teor de sólidos de 5 % (m/v) de massa seca em um volume final de 50 mL. As amostras em duplicata foram incubadas em incubadora orbital com agitação de 200 rpm sendo realizadas coletas de pontos nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas, respeitando a proporção de até 10% do volume total da reação. Cada amostra coletada foi centrifugada a 14.000 x *g* por 10 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados e congelados para determinar posteriormente a concentração de carboidratos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

6.3.5. Composição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, deslignificado com pré-tratamento alcalino (BD) e com pré-tratamento hidrotérmico sem a separação do licor gerado (denominado de *Slurry*), foram utilizados para os ensaios de hidrólises. Estes bagaços foram gentilmente cedidos e caracterizados pela Dra. Sarita Cândido Rabelo, e pelo grupo de estudos de pré-tratamentos físico-químicos do CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol) atual LNBR (Laboratório Nacional de Biorrenováveis).

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* é composto de 42,79% $\pm$ 0,73 de celulose, 28,9% $\pm$ 0,72 de hemicelulose, 18,77 % $\pm$ 0,79 de lignina, 3,71% $\pm$ 0,05 de grupos acetil e 1,67 % $\pm$ 0,14 de cinzas. O bagaço deslignificado (BD) pré-tratado com uma solução de 1,5% de NaOH m/v a 130 °C por 30 minutos é composto por 58,6 % $\pm$ 1,2 de celulose 22,1% $\pm$ 1,4, lignina 8,8% $\pm$ 0,9 e 10,0% $\pm$ 0,4 de cinzas. O bagaço hidrotérmico pré-tratado a 190 °C por 10 minutos sem a separação do licor gerado (*Slurry*) é composto por 57,52% $\pm$ 0,40 % de celulose, lignina 28,50% $\pm$ 0,24 e grupo acetil 0,02%.

6.3.6. Quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Os ensaios de quantificação por HPLC foram realizados em colaboração com o setor de química analítica do CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol), atual LNBR (Laboratório Nacional de Biorrenováveis).

A xilose e a glicose liberada em testes de hidrólise foram determinadas por Cromatografia de Troca Iônica de *Alta Performance* (*High Performance Anion Exchange Chromatography* – HPAEC) em equipado com coluna de separação CarboPac PA-1 (4 x 250 mm), em um sistema de cromatografia Dionex ICS-3000, com detecção amperométrica pulsada (PAD). O tempo de retenção e a concentração de soluções foram comparados como padrões de glicose e xilose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

6.3.7. Caracterização enzimática dos extratos enzimáticos utilizados na hidrólise em ESTÁGIO 2.

Para avaliar a capacidade de sacarificação e caracterizar os coquetéis selecionados e utilizados no ESTÁGIO 2 (combinados e isolados), foram realizadas as atividades enzimáticas dos coquetéis em diferentes de substratos sintéticos. Desse modo, os coquetéis foram avaliados com 240 horas de fermentação submersa, concentrados 20 vezes (para manter a mesma quantidade de FPU nos ensaios de maior escala), nas respectivas temperaturas ótimas de hidrólise: *T. aurantiacus* CBMAI 756 60 °C, *R. composticola* FMG6 60 °C, coquetel comercial CELLIC® CTec2 50 °C e as combinações de *T. aurantiaus* CBMAI 756 com *R. composticola* FMG6, 75%:+ 25% de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com CELLIC® CTec2 a 60 °C. As temperaturas utilizadas foram determinadas em ensaios que verificaram as melhores atuações dos coquetéis isolados e combinações.

Os substratos comerciais sintéticos utilizados para o painel de atividade foram: carboximetilcelulose (CMC), Avicel (Sigmacell – Sigma®), pectina de frutas cítricas e xilana de madeira faia (Sigma-Aldrich). Esses substratos foram utilizados para determinar as atividades enzimáticas de endoglucanase, avicelase e xilanase, respectivamente. Para as atividades enzimáticas de arabinanase e α -L-arabinofuranosidase, utilizamos os substratos arabinana linear, arabinana desramificada e arabinana de beterraba (*Megazyme*). As atividades enzimáticas de liquenase, mananase e xiloglucanase foram avaliadas utilizando os substratos β -glucano de cevada, liquenano, manana e xiloglucano de tamarindo (*Megazyme*),

respectivamente. A atividade de xilanase também foi avaliada utilizando o substrato arabinoxilana de centeio (*Megazyme*).

Os ensaios foram realizados em microplacas de atividade contendo 50 μL de solução 0,5 % (m/v) do substrato dissolvido em água, 40 μL de tampão citrato pH 4,8 e 10 μL de extrato enzimático. Para as amostras controle foi utilizado água em vez de coquetel enzimático. Os ensaios foram preparados em microplacas para de 96 poços e incubadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems®), por 10 minutos. Os açúcares redutores liberado nas reações enzimáticas foi quantificado pelo método do ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959), adaptado para microreações.

As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro (Infinite® 200 PRO – TECAN) a 540 nm logo em seguida da incubação, a 99 °C por 5 minutos. As atividades enzimáticas foram calculadas usando uma curva padrão de calibração nas mesmas condições do ensaio de microplacas preparadas com D-glicose ou D-xilose (Sigma-Aldrich) dependendo do substrato utilizado. Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores liberados por minuto por mL de enzima a na temperatura das condições de ensaio.

Os substratos cromogênicos como o p-nitrofenil- β -L-arabinofuranosídeo (pNPA), p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX), p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (pNPC), p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) (todos da Sigma-Aldrich) foram utilizados para determinar as atividades de L-arabinofuranosidase, β -xilosidase, celobiohidrolases e β -glicosidase, respectivamente.

Esses ensaios também foram realizados nos volumes de 50 μL da solução de substrato a 4 mM, 40 μL de tampão citrato pH 4,8 e 10 μL de extrato enzimático em microplacas de 96 poços, em termociclador Veriti (Applied Biosystems®), por 10 minutos. Em seguida, 100 μL de Ca_2CO_3 1M foi adicionado para finalizar cada reação. Em placas de leitura de 96 poços, foram realizadas leituras da absorbância, determinada a 400 nm em espectrofotômetro (Infinite® 200 PRO – TECAN). Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) para cada substrato cromogênico foi definido como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições de ensaio.

6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1. Produção de extratos enzimáticos para avaliação da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (Screening de combinações)

As três cepas termofílicas apresentaram resultados superiores para a produção de FPAse e proteínas totais quando comparada a cepa modificada de *T. reesei* RUT C30, utilizada como controle Tabela 6. A maior produção de FPAse ocorreu para *R. composticola* FMG6 $0,496 \pm 0,011$ e a maior produção de proteínas ocorreu para *T. aurantiacus* CBMAI 756 $0,39 \pm 0,055$. *R. composticola* FMG6 produziu maiores quantidades de FPAse comparado com *T. aurantiacus* CBMAI 756, reconhecida por secretar grandes quantidades de eficientes celulasas (GOMES et al., 2000; SCHUERG et al., 2017b). Esses resultados evidenciaram o potencial do extrato enzimático da espécie *R. composticola* para hidrolisar celulose. Kawamori; Takayama e Takasawa (1987) observaram uma maior produção de CMCase para o fungo *T. aurantiacus* em comparação *T. reesei* QM9414 em diversos indutores.

Tabela 6. Quantificação de proteínas totais e FPU para os extratos de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. emersonii* COQ, *R. composticola* FMG6 e *T. reesei* RUT C30.

	<i>T. aurantiacus</i>	<i>R. composticola</i>	<i>R. emersonii</i>	<i>T. reesei</i> RUT C30
Fpease FPU/mL	$0,38 \pm 0,100$	$0,496 \pm 0,011$	$0,42 \pm 0,033$	$0,24 \pm 0,001$
Proteínas Totais mg/mL	$0,39 \pm 0,055$	$0,34 \pm 0,011$	$0,20 \pm 0,010$	$0,16 \pm 0,02$

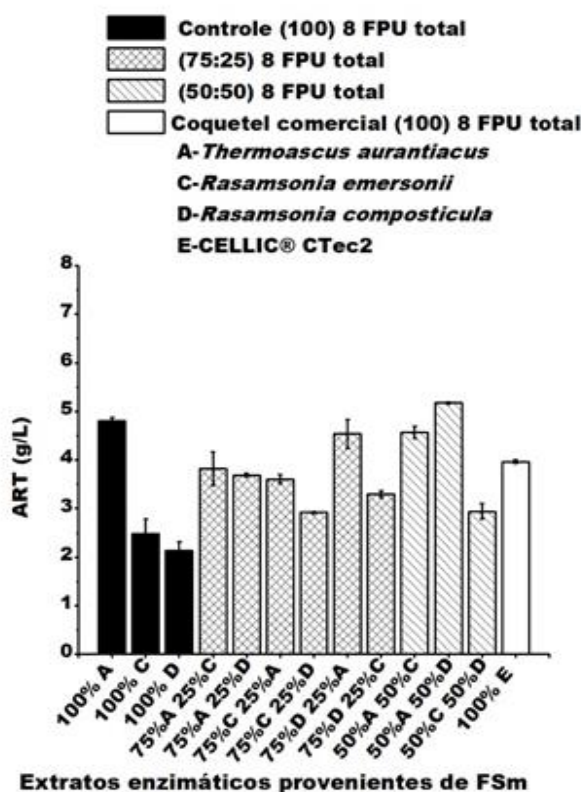
Fonte: Elaborado pelo autor.

No capítulo 2, anteriormente descrito, no tempo de 240 horas de fermentação, foram identificadas todas CAZymes secretadas para as três espécies *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6, *R. emersonii* COQ. Uma vez que o objetivo deste trabalho não foi otimizar o melhor tempo de produção enzimática, e sim a maior produção obtida, os extratos de fungos neste capítulo, foram produzidos diretamente no tempo de 240 horas, para serem avaliados e comparados frente o potencial de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Sendo assim, o tempo de 240 horas de fermentação foi escolhido para os experimentos de hidrólise, visando comparar o potencial de sacarificação dos diferentes fungos em diferentes fermentações.

6.4.2. Avaliação do potencial de sacarificação de hidrólise dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6 produzidos por FSm.

A avaliação dos coquetéis enzimáticos de fungos termofílicos *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6 ocorreram por meio da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Os ensaios foram realizados com os extratos individuais e combinados entre si, baseado em atividade FPAse. Todos os extratos utilizados para a sacarificação enzimática liberaram açúcares redutores do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como demonstrado na Figura 17.

Figura 17. Liberação de ART (açúcares redutores totais) pela hidrólise de bagaço *in natura* (ESTÁGIO 1) de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6 e suas combinações. O coquetel comercial CELLIC® CTec2 foi utilizado de controle. Hidrólise realizada em 24 horas, 5% de biomassa (50 mg), a 60 °C, em tampão citrato 0,05M pH 4.8. Extratos enzimáticos utilizados foram provenientes de FSm durante 240 horas de fermentação. Todos os ensaios apresentaram a dosagem de a 0,4 FPU total por reação, representando 8 FPU/g.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O bagaço de cana-de-açúcar é considerado um dos materiais lignocelulósicos de maior recalcitrância entre as potenciais biomassas utilizadas para a produção de E2G. O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* possui uma das maiores quantidades de lignina em comparação a palha de arroz, palha de trigo, palha de milho, capim elefante e capim mombaça. (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2013; SAHA, 2003; STRAW; SAHA; COTTA, 2006). Nesse contexto, a presença de lignina em elevados teores dificulta o acesso das enzimas, tornando a parede celular vegetal mais recalcitrante (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2013).

Devido a essa recalcitrância, o bagaço de cana-de-açúcar necessita de pré-tratamento antes da sacarificação enzimática, o que justifica os baixos teores de açúcares redutores encontrados na sacarificação representada na Figura 17, na utilização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

O pré-tratamento resulta no melhor acesso das enzimas às frações celulósicas, hemicelulósicas, além de proporcionar a abertura da bainha de lignina. Isso aumenta a área superficial e porosidade do substrato, ocasionando assim maiores rendimentos de hidrólise (ALVIRA et al., 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; SUN; CHENG, 2002).

Na avaliação da sacarificação dos extratos enzimáticos individuais em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, observa-se que *T. aurantiacus* CBMAI 756 obteve o melhor rendimento, liberando a maior quantidade de açúcares redutores totais em comparação com os extratos de *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6 (Figura 17). O extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 liberou inclusive mais açúcares redutores que o coquetel comercial CELLIC® CTec2. A hidrólise do coquetel comercial CELLIC® CTec2 ocorreu a 50 °C em tampão citrato pH 4,8 0,05 M, condições ótimas para esse arsenal enzimático, como determinado pelo fabricante.

Além disso, o extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, ao ser combinado em qualquer proporção neste experimento [75 % (0,3FPU), 50% (0,2FPU) e 25% (0,1FPU)], com os extratos de *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6, resultou na melhora de rendimentos em relação aos extratos individuais de *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6 (Figura17).

Visser et al. (2013) relataram que combinações de extratos enzimáticos de fungos de espécies diferentes podem proporcionar sinergia entre as enzimas, resultando em melhores rendimentos de sacarificação. Esses autores mostraram que a mistura dos extratos enzimáticos produzidos por *Chrysosporthe cubensis* e *Penicillium pinophilum* podem resultar em sinergia em relação às principais atividades de celulase, bem como a inclusão de enzimas acessórias,

proporcionando um aumento na eficiência de sacarificação em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado do novo coquetel.

Movio (2014) e Pinto (2010) mostraram que o potencial do extrato de *T. aurantiacus* pode aumentar o rendimento de sacarificação de outros extratos, no entanto esses experimentos foram realizados apenas por extratos produzidos por FES. Contudo, em nossos resultados, observamos que o extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 produzido por FSm apresentou também o potencial em melhorar o rendimento hidrolítico de outros coquetéis enzimáticos termofílicos do gênero *Rasamsonia*, reconhecido por produzir eficientes coquetéis enzimáticos celulolíticos (PERKINS et al., 2015).

Uma vez que a FSm é um processo que possui maior aplicabilidade industrial – e também a estratégia mais estudada para a produção em larga escala de enzimas (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016), nossos resultados são promissões para nortear o desenvolvimento de um futuro coquetel termofílico com aplicação na sacarificação.

A melhor combinação de extratos enzimáticos obtida apresentou 50% (0,2 FPU) do extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + 50% (0,2 FPU) de *R. composticola* FMG6, liberando 5,17 g/L de açúcares redutores totais (ART) em comparação com a liberação de 4,81 g/L do extrato isolado de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e 2,14 g/L do extrato isolado de *R. composticola* FMG6. Deste modo, essa combinação aumentou 7,62% e 142,05% a liberação de açúcares redutores, quando comparado aos extratos não combinados de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6, respectivamente (Figura 17). No entanto, não foram todas as combinações com os extratos de *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6 que melhoraram o rendimento do extrato enzimático individual de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (Figura 17).

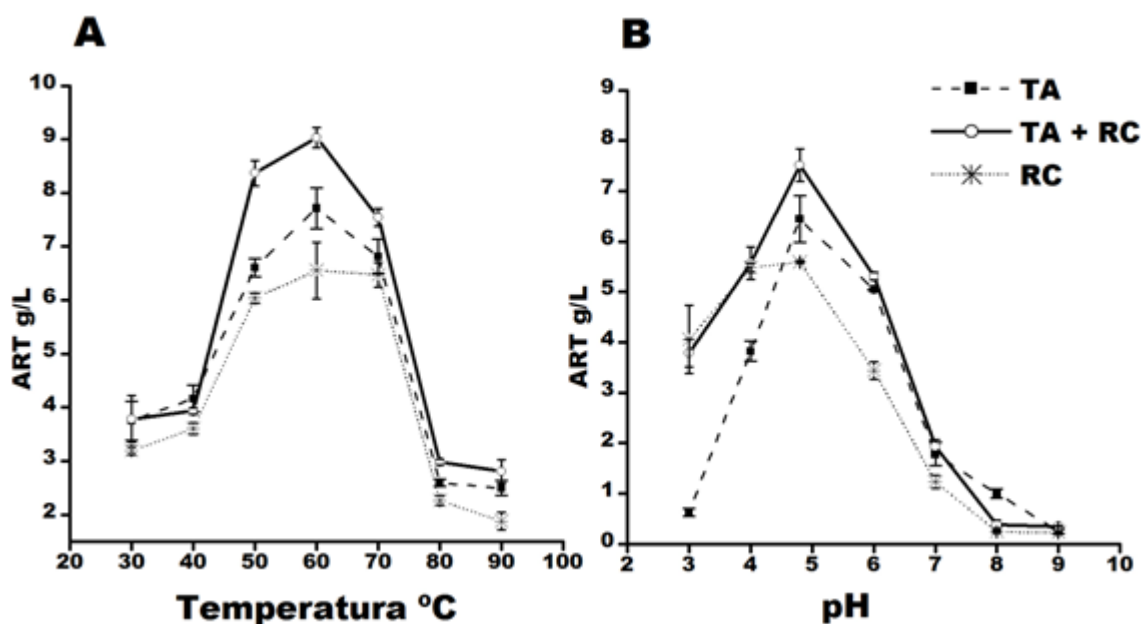
Em vista da maior liberação de açúcares redutores da combinação composta pelos coquetéis de *T. aurantiacus* 50% (0,2 FPU) + 50% (0,2 FPU) de *R. composticola*, esta foi selecionada para a otimização das condições de hidrólise e para posteriores avaliações em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Conforme a caracterização do secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6 obtida no capítulo 2, pode-se afirmar que a diversidade de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e acessórias foi aumentada com a combinação dos dois extratos. Além disso, a caracterização pelos estudos de proteômica evidenciam enzimas únicas para cada extrato e expressões em quantidades diferentes das enzimas em comum. Desse modo, pode-se confirmar o potencial da combinação dos dois coquetéis enzimáticos e a formação de um novo arsenal enzimático termofílico promissor.

6.4.3. Otimização das condições de sacarificação das melhores combinações dos extratos de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6.

O coquetel enzimático composto por 50% (0,2 FPU) de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + 50% (0,2 FPU) do extrato de *R. composticola* FMG6 e seus respectivos coquetéis individuais foram caracterizados quanto à temperatura para sacarificar o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Esses ensaios foram avaliados com base na liberação de açúcares redutores total.

Figura 18. Efeito do pH e da temperatura sobre a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* na liberação de ART (açúcares redutores totais). Coquetéis individuais *T. aurantiacus* CBMAI 756 (TA), *R. composticola* FMG6 (RC) e a melhor combinação (TA+RC) de 50%+50% de FPU. Hidrólise com dosagem total de 8 FPU/g por ensaio. As reações ocorreram em ESTÁGIO 1 (1 mL), com bagaço *in natura* com 5% de sólidos, em triplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor

Os extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6 individuais, mais a combinação, apresentaram a temperatura e pH ótimos a 60 °C e 4,8, respectivamente (Figura 18). Nessas condições, ocorreram as maiores liberações de açúcares redutores. Também foram nas condições de 60 °C e pH 4,8 que a combinação dos extratos demonstrou obter a maior interação para sacarificar bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. O novo coquetel enzimático composto por 50% (0,2 FPU) do extrato de *T. aurantiacus* CBMAI

756 + 50% (0,2 FPU) do extrato de *R. composticola* FMG6, apesar de apresentar o melhor desempenho a 60 °C e pH 4,8, também foi ativo nos pH 4 e 6, apresentando uma capacidade de sacarificação em torno de 60%. No entanto, nestas condições de pH, não foi observado melhora de rendimento da sacarificação pela combinação dos dois coquetéis em relação aos extratos individuais, como observado no pH 4,8 (ótimo da mistura).

Quanto ao efeito da temperatura, a combinação de extratos enzimáticos manteve-se a 70 °C com 83% de atividade do coquetel. O arsenal enzimático individual do isolado *R. composticola* FMG6, destacou-se pela versatilidade de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar *in natura* entre 50 °C e 70 °C, no qual manteve uma atividade relativa do coquetel de 92,14 % a 50 °C e 98,75% a 70 °C, quando comparado à sua temperatura ótima de 60 °C. Essas análises foram as primeiras a ser realizadas para caracterizar a faixa de atuação do coquetel enzimático de *R. composticola* FMG6. A atuação das enzimas de *R. composticola* FMG6 em temperaturas elevadas está de acordo com as das espécies relatadas pertencentes ao gênero *Rasamsonia* (HOUBRAKEN; DE VRIES; SAMSON, 2014).

R. emersonii é a espécie do gênero em que mais apresenta estudos referentes a composição do seu arsenal enzimático termofílico do gênero. Esta espécie produz uma variedade de coquetéis enzimáticos lignocelulolíticos que funcionam a temperaturas de 10-20 °C acima das enzimas comercialmente disponíveis, como os coquetéis de *Trichoderma* (VIIKARI et al., 2007)

O arsenal enzimático de *R. composticola* FMG6 também obteve destaque ao hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar *in natura* em condições ácidas (pH 3 e 4), mantendo uma atividade relativa de 68,27% e 94,08% respectivamente, quando comparado ao pH ótimo. A capacidade de hidrólise em valores de pH baixos, como apresentado pelo extrato enzimático produzido por *R. composticola* FMG6, pode ser desejável em processos industriais, uma vez que biomassas são frequentemente pré-tratada com ácido. Assim, caso a sacarificação seja realizada por enzimas capazes de atuar a pH baixos, não há necessidades de ajustes do pH por agentes tamponantes. A ausência de tamponamento leva a uma economia para o processo, pois implica em uma menor exigência de hidróxido de sódio ou sulfato de cálcio, não resultando em sal residual. Portanto, o processo pode ser realizado sem desperdício e sem a necessidade da entrada química inorgânica (PERKINS et al., 2015).

A espécie *R. composticola* possui um único registro de isolamento até o momento, sendo isolada e descrita por Su; Cai (2012). Não há relatos até o momento de estudos sobre a atividade enzimática do seu coquetel secretado e a possível aplicação dessas enzimas na sacarificação de biomassas vegetais, como realizados neste trabalho. Nossos resultados

mostraram que essa espécie apresentou enzimas com temperaturas de atuação elevadas (Figura 18) temperaturas essas, características para as enzimas do gênero *Rasamsonia*.

6.4.4. Combinação dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com coquetel comercial CELLIC® CTec2

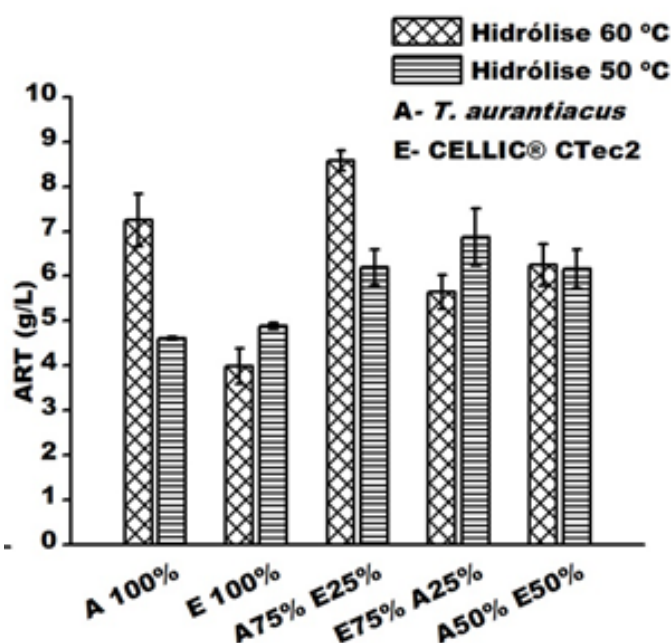
Uma vez que o coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, ao suplementar em qualquer proporção os extratos enzimáticos de fungos *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6, aumentou a liberação de açúcares redutores, o coquetel comercial CELLIC® CTec2 (Novozymes) foi selecionado para ser suplementado com o extrato de *T. aurantiacus*.

As enzimas comerciais CELLIC® CTec2 são utilizadas comumente nos processos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos com o intuito de obter açúcares fermentescíveis para a produção de etanol. No entanto, esforços têm sido realizados para aumentar a eficiência de coquetéis e reduzir custos da produção de enzimas para viabilizar o E2G (KOLASA et al., 2014; NOVOZYMES, 2012). Assim, para melhorar os rendimentos de hidrólise do coquetel comercial CELLIC® CTec2 frente a biomassas recalcitrantes como o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, foram realizadas combinações de diferentes concentrações do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

O extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 melhorou a liberação de açúcares redutores totais ao suplementar CELLIC®CTec2, combinado em qualquer proporção [75% (0,3FPU), 50% (0,2FPU) e (25% 0,1FPU)] tanto a 60 °C (temperatura ótima do coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756) como a 50 °C (temperatura de hidrólise ótima do coquetel comercial) (Figura 19). No entanto, não foram todas as combinações com CELLIC® CTec2 que melhoraram o rendimento de sacarificação de *T. aurantiacus* CBMAI 756, quando comparado à sacarificação de *T. aurantiacus* CBMAI 756 isolado (Figura 19).

A melhor combinação obtida foi com 75% (0,3 FPU) de extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e 25% (0,1 FPU) de CELLIC® CTec2 a 60 °C, liberando $8,58 \pm 0,23$ g/L em relação a $6,20 \pm 0,39$ g/L de ART na mesma combinação na temperatura de 50 °C. O extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, aplicado isoladamente a 60 °C, liberou $7,25 \pm 0,58$ g/L de ART. Por outro lado, CELLIC® CTec2, em sua temperatura ótima de 50 °C, liberou somente $4,88 \pm 0,07$ g/L. Deste modo, a melhor combinação aumentou o rendimento da sacarificação em 18,34% e 75,81% em relação aos controles isolados no ótimo de atuação; *T. aurantiacus* CBMAI 756 isolado (a 60 °C) e CELLIC® CTec2 isolado (a 50 °C), respectivamente (Figura 19).

Figura 19. Liberação de açúcares redutores totais (ART) após a sacarificação de bagaço *in natura* por 24 horas (ESTÁGIO 1) utilizando extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (A), CELLIC® CTec2 (E) e suas combinações. Experimento realizado em 5% de biomassa, a 60 °C (temperatura ótima para o coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756) e 50 °C (temperatura ótima para o coquetel comercial), em tampão citrato pH 4.8. Todos ensaios apresentaram com a dosagem de 0,4 FPU por reação (8 FPU/g).



Fonte: Elaborado pelo autor

Neste cenário, a melhor combinação obteve uma sacarificação mais eficiente pela mesma unidade de FPU que os outros ensaios. Assim, esses resultados forneceram uma base promissora para produzir e formular coquetéis enzimáticos melhorados utilizando o arsenal enzimático termofílico do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

6.4.5. Sacarificação utilizando as melhores combinações avaliadas no ESTÁGIO 1

Os experimentos realizados até o momento avaliaram os açúcares redutores dos extratos enzimáticos por microrreações (1 mL) de sacarificação (ESTÁGIO 1) do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Os coquetéis que obtiveram as maiores liberações de açúcares redutores pela sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foram selecionados para ensaios no ESTÁGIO 2 (50 mL). Nesse tipo de sacarificação, volumes maiores foram utilizados possibilitando a quantificação de glicose e xilose ao longo de 12, 24, 48 e 72 horas.

As mesmas condições adotadas para as melhores combinações hidrólises em ESTÁGIO 1 nos itens anteriores, foram mantidas. Portanto, foram mantidas dosagens totais de 8FPU/g em todos os ensaios, porcentagem de sólidos (5%), temperaturas e pH ótimos para cada coquetel avaliado.

Os coquetéis selecionados foram: 4 FPU/g de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + 4 FPU/g de *R. composticola* FMG6 (50% + 50%) e 6 FPU/g de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + 2 FPU/g de CELLIC® CTec2 (75%+ 25% de FPU) foram utilizados para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, com pré-tratamento alcalino (BD) e bagaço hidrotérmico sem a separação do licor resultante (*Slurry*).

6.4.6. Quantificação de glicose e xilose proveniente da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* ESTÁGIO 2 (50 mL).

Os resultados para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* demonstraram que os extratos enzimáticos dos termofílicos *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6 e a combinação desses extratos alcançaram níveis superiores de liberação de glicose em relação ao coquetel comercial CELLIC® CTec2, mesmo quando comparado ao ótimo do coquetel comercial (50 °C) e na mesma dosagem de atividade enzimática (FPU) (Figura 19 A). A combinação dos coquetéis de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2 se mostrou superior para a liberação de glicose em relação aos dos coquetéis individuais de *T. aurantiacus* e CELLIC® CTec2 (Figura 20 A).

No ponto de maior obtenção de glicose (72 horas), os extratos de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. composticola* FMG6, *T. aurantiacus* CBMAI 756 + *R. composticola* FMG6 e *T. aurantiacus* CBMAI 756+ CELLIC® CTec2 liberaram 1,6, 1,65, 2,04 e 1,89 vezes mais glicose de que o coquetel comercial CELLIC® CTec2 isolado, respectivamente. Nesse ponto, a combinação *T. aurantiacus* CBMAI 756 + *R. composticola* FMG6 obteve a maior liberação de glicose, $4,22 \pm 0,15$ g/L, na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, em comparação a liberação de $3,25 \pm 0,12$ g/L de *T. aurantiacus* CBMAI 756 isolado, $3,30 \pm 0,33$ g/L de *R. composticola* FMG6 isolado, $3,90 \pm 0,09$ g/L de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2 e por fim $2,96 \pm 0,04$ g/L de CELLIC® CTec2 (Figuras 20A e 21A).

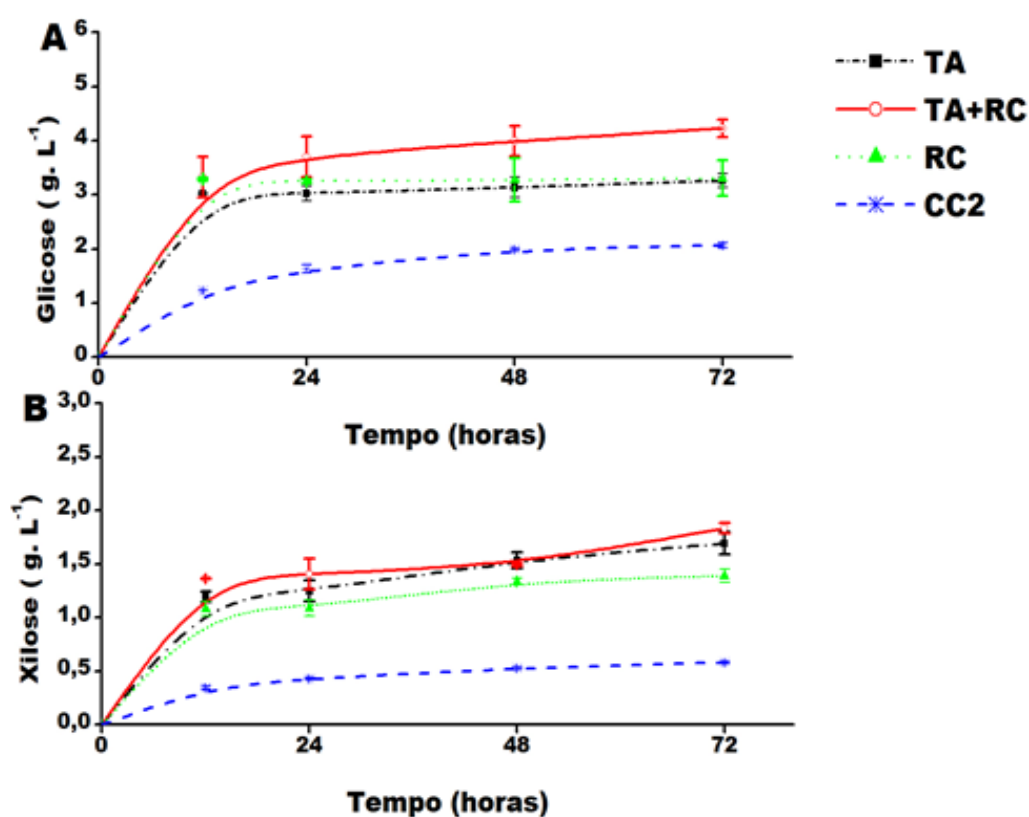
Níveis superiores de liberação de xilose para todos os coquetéis avaliados em relação à CELLIC® CTec2 também foram observados após 72 horas de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (Figura 20 B e Figura 21 B). A combinação *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6 também liberou maiores concentrações de xilose $1,83 \pm 0,05$ g/L em comparação com $1,69 \pm 0,10$ de *T. aurantiacus* CBMAI 756, $1,39 \pm 0,06$ de *R.*

composticola FMG6, $1,76 \pm 0,013$ de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e CELLIC® CTec2 e, por fim, apenas $0,582 \pm 0,09$ de CELLIC® CTec2 (Figuras 20 B e 21B).

Rosgaard et al. (2006) verificaram o aumento da liberação de glicose ao suplementar Celluclast e Novozymes 188 com extrato bruto de fungo termofílico indicando que extratos de fungo termofílicos são instrumentos para a identificação de novas proteínas acessórias, que melhoram a hidrólise de celulose. Enzimas termoestáveis, ao sacarificar a lignocelulose em açúcares, melhoram significativamente a taxa de conversão da biomassa sobre as suas homólogas mesofílicas (YEOMAN et al., 2010, VIIKARI et al., 2007 MCCLADON et al., 2012).

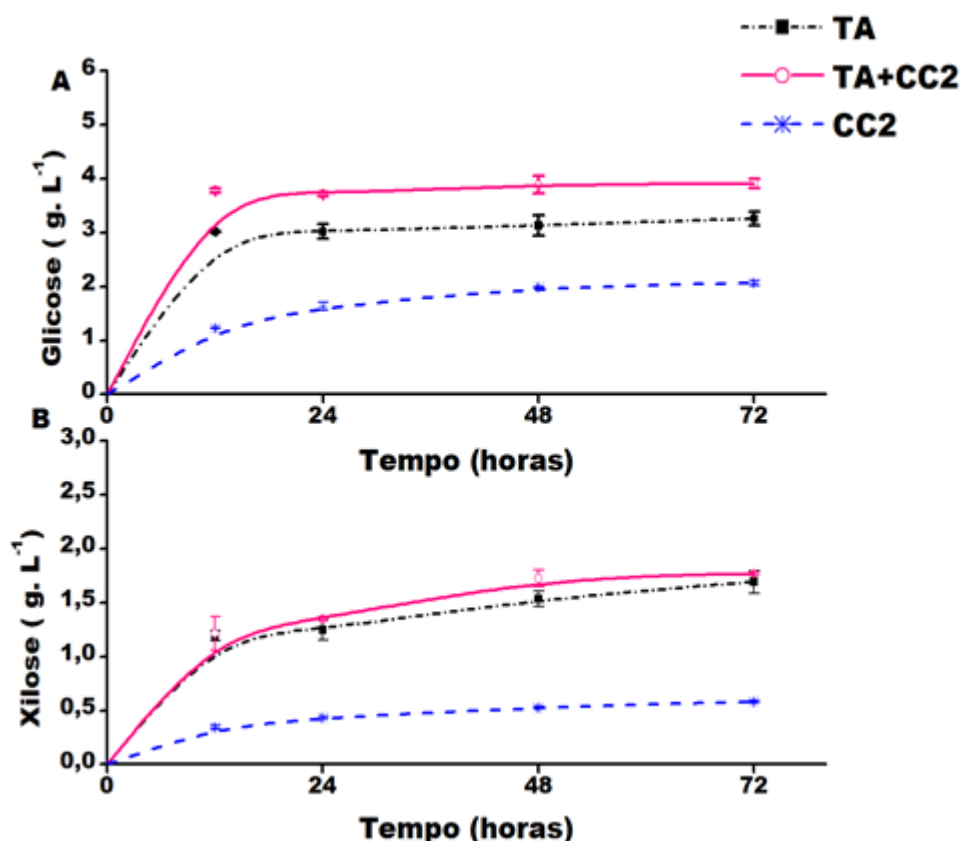
Deste modo, em relação a liberação de glicose, as combinações foram melhores que o coquetel comercial CELLIC® CTec2 e também melhores em relação aos próprios extratos individuais (Figuras 20 A e 21A). Esses resultados corroboram com os resultados da hidrólise nas condições do ESTÁGIO 1, mostrando que as enzimas dos coquetéis avaliados ao serem combinadas, aumentaram a liberação de açúcares redutores totais e aumentaram a liberação dos açúcares fermentescíveis, como a glicose e xilose, em relação aos controles.

Figura 20. Efeitos dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (TA), *R. composticola* FMG6 (RC), CELLIC® CTec2 (CC2) e combinação de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + *R. composticola* FMG6 (TA+RC) na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Quantificação de glicose (A) e xilose (B) durante as 72 horas de sacarificação. Todos os ensaios apresentaram, volume de reação de 50 mL na dosagem de 0,4 FPU (8 FPU/g), 5 % de sólidos, tampão citrato 0,05 M pH 4.8, temperatura de 60°C para TA, TA+RC e RC e 50 °C para CC2.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 21. Efeitos dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (TA), combinação de CELLIC® CTec2 e *T. aurantiacus* CBMAI 756 (TA+CC2) e CELLIC® CTec2 (CC2) na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Quantificação de Glicose (A) e Xilose (B) durante as 72 horas de sacarificação. Todos os ensaios apresentaram volume de reação de 50 mL na dosagem de 0,4 FPU (8 FPU/g), 5 % de sólidos, tampão citrato 0,05 M pH 4,8, temperatura de 60°C para TA, TA+CC2 e 50 °C para CC2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As principais empresas produtoras de coquetéis comerciais possuem variedades de cepas de fungos filamentosos produtoras de enzimas e, dentre essas, *T. reesei* se destaca (PALOHEIMO; HAARMANN; MÄKINEN, 2016). Exemplo disso são os importantes coquetéis de celulasas comerciais, como CELLIC® CTec2 (Novozyme, América do Norte Inc.) derivados de gerações de estudo utilizando o complexo enzimático de *T. reesei*. Esse coquetel comercial contém pelo menos duas principais celobiohidrolases (Cel7A e Cel6A) e cinco endo-glucanases diferentes (Cel7B, Cel5A, Cel12A, Cel61A e Cel45A) de *T. reesei* com um alto nível de β -glucosidase (PEDERSEN; JOHANSEN; MEYER, 2011).

Kallioinen; Puranen e Siika-aho, (2014) compararam a mistura de enzimas termoestáveis de TaCel7A (CBHI), TaCel5A (EGII), TaXyn10 e TaCel3A (β G) de *T.*

aurantiacus com a mistura de enzimas de *T. reesei* para hidrolisar material lignocelulósico a 45 °C, na mesma carga de proteína por grama de substrato (10 mg/g). Os autores constataram que a eficiência da mistura enzimática termoestáveis a 45 °C foi claramente melhor que a da mistura composta das enzimas *T. reesei*. Esse experimento demonstrou que, mesmo na temperatura ótima do coquetel de *T. reesei* e uma temperatura inferior do ótimo para as enzimas termoestáveis, as enzimas termofílicas apresentaram maior rendimento na sacarificação.

Nossos resultados corroboram com os de Kallioinen; Puranen e Siika-aho, (2014), indicando que as enzimas termofílicas de *T. aurantiacus* CBMAI 756, produzidas no meio a base de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e palha de milho por FSm, podem ser uma alternativa para melhorar a eficiência de hidrólise de coquetéis enzimáticos com base no arsenal enzimático de *T. reesei*, como o CELLIC® CTec2.

Além disso, conforme a caracterização do secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756 obtida por proteômica no capítulo 2, pode-se afirmar que a diversidade de CAZymes do novo coquetel enzimático, obtido pela combinação de CELLIC® CTec2 + *T. aurantiacus* CBMAI 756, foi aumentada em relação ao coquetel isolado de *T. aurantiacus* CBMAI 756. As enzimas pertencentes a família GH12, GH45 e GH6 foram ausentes no coquetel isolado de *T. aurantiacus*, o que pode ter contribuído para aumentar seu potencial de sacarificação da celulose (Figura 21).

6.4.7. Quantificação por HPLC da glicose e xilose provenientes da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

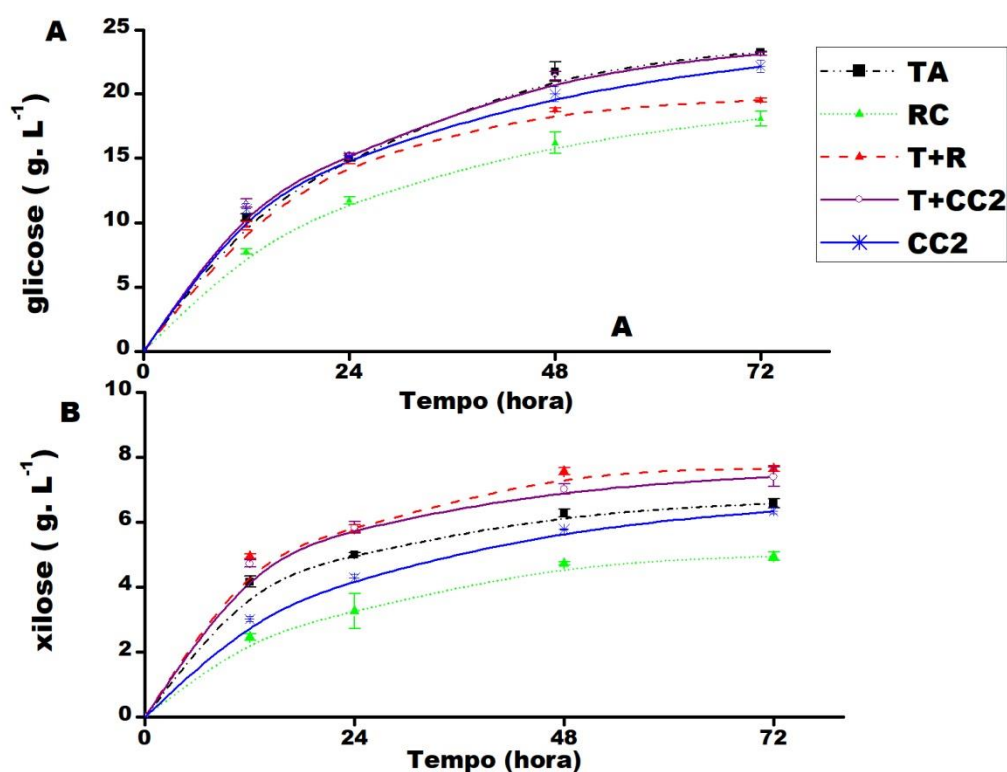
Os mesmos coquetéis utilizados para sacarificar bagaço de cana-de-açúcar *in natura* em ESTÁGIO 2 (50 mL) foram utilizados para sacarificar os bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 22 e 23.

Na hidrólise do bagaço pré-tratado alcalino (BD), observamos que o extrato enzimático *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2, na mesma dosagem de FPU que o coquetel comercial sozinho CELLIC® CTec2 (50 °C) liberaram 1,04 vezes mais glicose no tempo de 72 horas (Figura 22A). No entanto, essa combinação não apresentou teores maiores de glicose em relação ao extrato enzimático isolado de *T. aurantiacus* CBMAI 756, como ocorreu para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Para a liberação de xilose do bagaço BD, os coquetéis combinados de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + *R. composticola* FMG6 e *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2, no ponto de 48 horas, liberaram 1,30 e 1,21 vezes mais, respectivamente a mais que o coquetel

comercial CELLIC® CTec2. As combinações também liberaram no mesmo ponto de 48 horas mais xilose que os coquetéis individuais (Figura 22B).

Figura 22. Produção de glicose (A) e xilose (B) por tempo de sacarificação enzimática de bagaço de cana pré-tratado BD. Extratos enzimáticos produzidos por FSm, em meio de cultivo contendo farelo de trigo, bagaço de cana *in natura*, palha de milho (1:1:1), com 5% de sólidos em tampão citrato pH 4,8, 0,05M a 200rpm. *T. aurantiacus* CBMAI 756 (8FPU/g); TA+CC2 - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (6FPU/g) + CELLIC® CTec2 (2FPU/g); TA+RC - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (4FPU/g) + *R. composticola* FMG6 (4FPU/g); RC - *R. composticola* FMG6 (8FPU/g) a 60 °C e CC2 - CELLIC® CTec2 (8 FPU/g) a 50 °C.

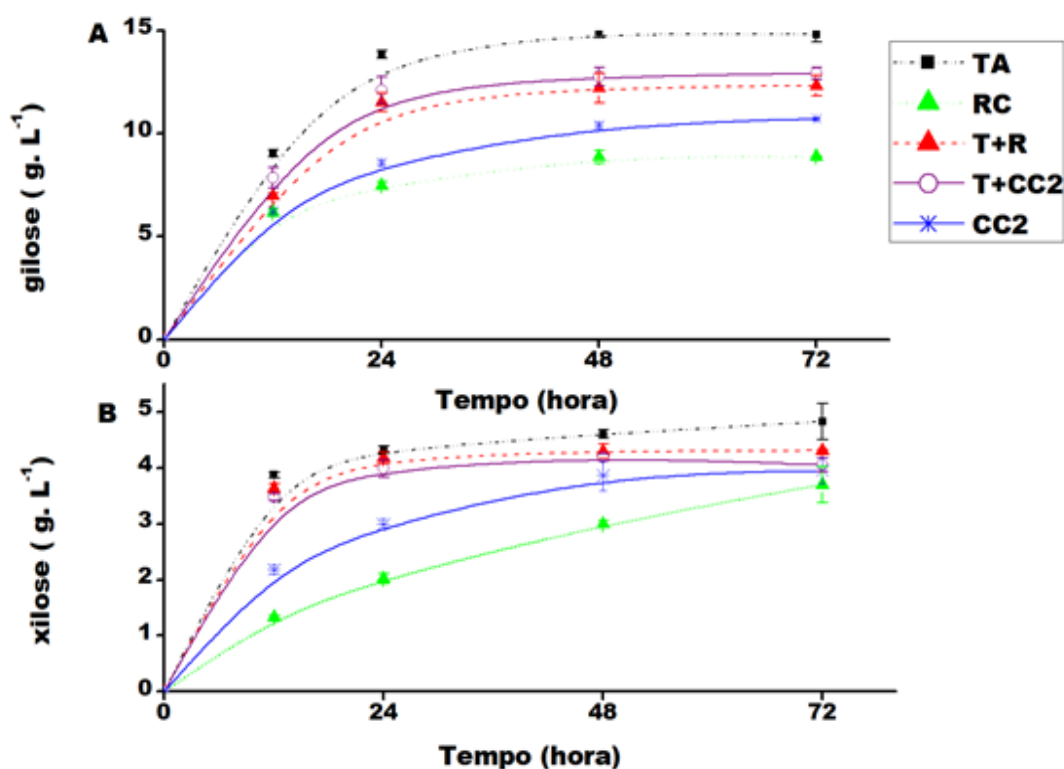


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar *Slurry*, observamos que os extratos enzimáticos do coquetel termofílico de *T. aurantiacus* CBMAI 756, a combinação *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2 e a combinação *T. aurantiacus* CBMAI 756 + *R. composticola* FMG6 alcançaram níveis superiores de liberação de glicose para o ponto de 72 horas, iguais a 1,38 vezes, 1,23 e 1,20, respectivamente em comparação ao ótimo do coquetel comercial CELLIC® CTec2 (50 °C) (Figura 22A). Para a liberação de xilose no

bagaço *Slurry*, o coquetel contendo apenas o extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, no ponto de 72 horas, liberou 1,22 vezes mais que o coquetel comercial CELLIC® CTec2 (Figura 22B), essa foi a maior liberação entre todos os coquetéis testados.

Figura 23. Produção de glicose (A) e xilose (B) por tempo de sacarificação enzimática de bagaço de cana pré-tratado *Slurry*. Extratos enzimáticos produzidos por FSm, em meio de cultivo contendo farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, palha de milho (1:1:1), com 5% de sólidos em tampão citrato pH 4,8, 0,05M a 200 rpm. TA - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (8FPU/g); TA+CC2 - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (6FPU/g) + CELLIC® CTec2 (2FPU/g); TA+RC - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (4FPU/g) + *R. composticola* FMG6 (4FPU/g); RC - *R. composticola* FMG6 (8FPU/g) a 60 °C e CC2 - CELLIC® CTec2 (8 FPU/g) a 50 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Kallioinen; Puranen e Siika-aho, (2014) demonstraram que, para a hidrolisar uma mesma biomassa com diferentes pré-tratamentos, são necessários coquetéis enzimáticos com proporções diferentes de enzimas específicas. Nossos resultados corroboraram com esse estudo, pois em diferentes tratamentos de bagaços de cana-de-açúcar, observamos diferentes

eficiências de sacarificação dos mesmos coquetéis testados. Algumas interações entre os coquetéis combinados não foram tão eficientes em bagaço pré-tratado quando comparado como bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Por exemplo, no bagaço *Slurry*, o coquetel enzimático isolado de *T. aurantiacus* CBMAI 756 liberou mais glicose e xilose que as combinações de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + *R. composticola* FMG6 e *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2.

No entanto, a utilização do coquetel termofílico do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756, mesmo em biomassas de alta recalcitrância como a cana-de-açúcar *in natura* e em diferentes pré-tratamentos, mostrou-se superior ou equivalente a liberação de glicose e xilose do coquetel comercial CELLIC®CTec2 para os dois tipos de bagaço pré-tratado. Além disso, seu arsenal enzimático aumentou a liberação de glicose e xilose de outros coquetéis, como o de *R. composticola* FMG6 e do próprio CELLIC® CTec2, nos três bagaços pesquisados.

R. composticola FMG6, cultivado em material lignocelulósico, demonstrou também produzir um diversificado coquetel enzimático, capaz de sacarificar o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, bagaço pré-tratado BD e *Slurry*. Assim, *R. composticola* indica ser uma plataforma de enzimas termofílicas, até então não explorada, com enzimas capazes de atuar eficientemente no processo de sacarificação para a liberação de açúcares fermentescíveis de bagaço de cana-de-açúcar.

O bagaço pré-tratado BD foi o bagaço em que se obteve as maiores quantidades de glicose e xilose para todos os coquetéis avaliados neste trabalho, demonstrando ser o melhor bagaço para a obtenção de açúcares fermentescíveis entre os três bagaços testados. Contudo, arsenais enzimáticos com capacidade de hidrolisar uma biomassa sem pré-tratamento químico ou físico é de grande vantagem econômica para o E2G, posto que o pré-tratamento da biomassa é um dos grandes gargalos econômicos para este processo (LEE et al., 2007; MA et al., 2010; MOSIER et al., 2005; WYMAN et al., 2005). Assim, o potencial hidrolítico dos arsenais enzimáticos termofílicos de *T. aurantiacus* e *R. composticola* merecem atenção pelo potencial em hidrolisar material lignocelulósico de alta recalcitrância como bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, melhor que o coquetel comercial CELLIC® CTec2.

6.4.8. Atividade dos coquetéis enzimáticos em painel de substratos utilizados na sacarificação

Os coquetéis enzimáticos selecionados para hidrólise em ESTÁGIO 2 utilizados na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, pré-tratado BD e pré-tratado *Slurry* foram testados frente a capacidade de hidrolisar substratos sintéticos. Esses ensaios foram

realizados para a caracterização e comparação quanto as atividades enzimáticas dos coquetéis individuais e combinados, utilizados na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados dos testes de atividade enzimática com os diferentes substratos avaliados estão representados na Figuras 24 e 25.

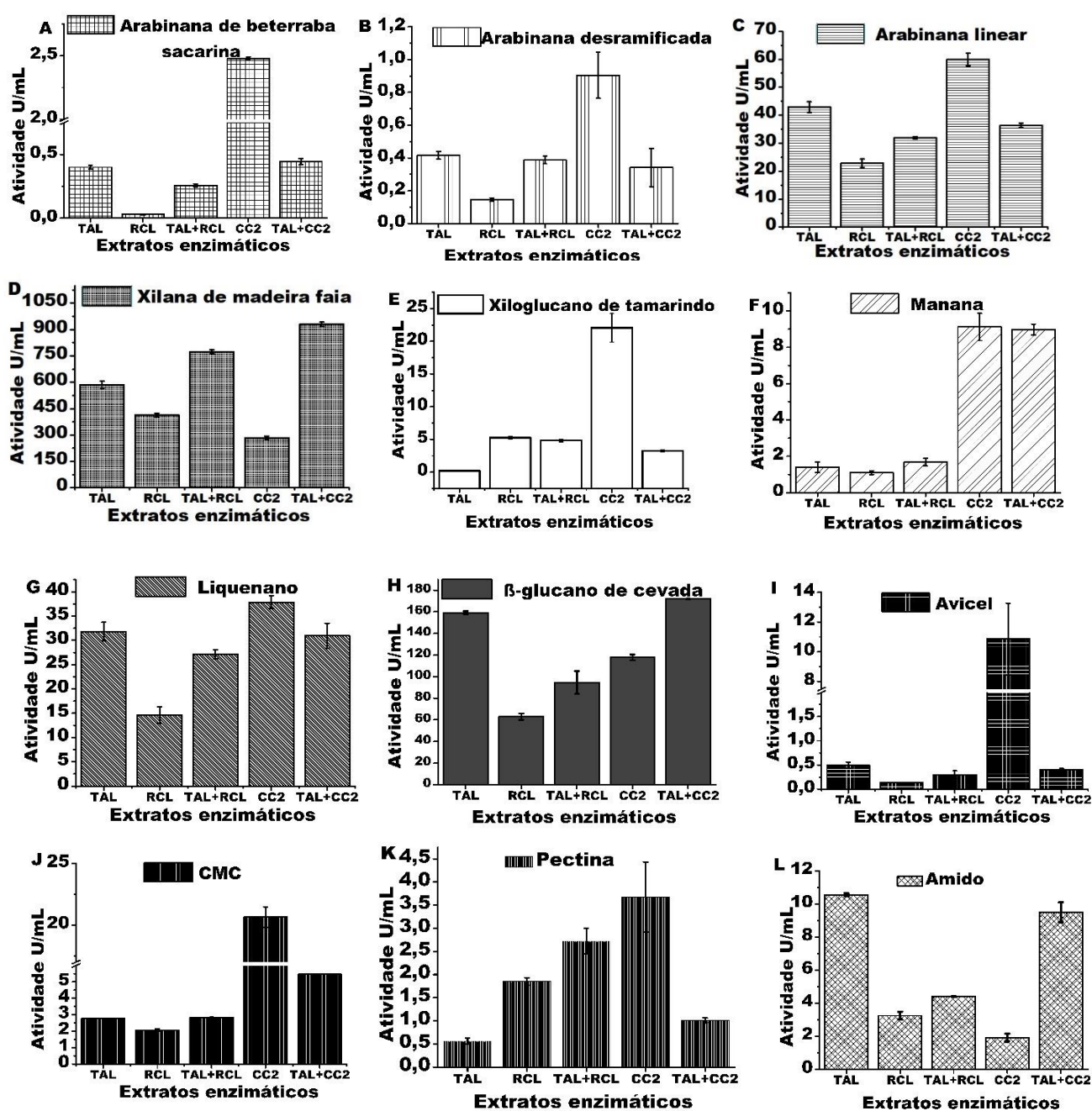
Os substratos sintéticos utilizados para a realização do painel de substrato foram: arabinana desramificada, arabinana de beterraba, arabinoxilana, xilana, CMC, avicel, β -glucano, liquenano, manana, pectina e xiloglucano, indicando a possível presença nesta amostra das atividades enzimáticas de arabinanase, α -L-arabinofuranosidase, xilanase, endoglucanase, avicelase, liquenase, mananase, pectinase, poligalacturonase e xiloglucanase (Figura 24).

Substratos cromogênico como o p-nitrofenil- β -L-arabinofuranosídeo (pNPA), p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX), p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (pNPC), p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) foram utilizados para determinar as atividades de L-arabinofuranosidase, β -xilosidase, celobiohidrolases e β -glicosidase, respectivamente (Figura 25).

Avaliando-se os extratos enzimáticos individuais, a maior atividade foi encontrada para o extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 em relação o extrato de *R. composticola* FMG6 nos substratos de arabinana de beterraba (13,79 vezes), arabinada desramificada (2,84 vezes), arabinana linear (1,87 vezes), liquenana (2,17 vezes), β -glucano (2,5 vezes), amido (3,2 vezes) manana (1,27 vezes), avicel (3,65), CMCCase (1,34 vezes), xilana de madeira faia (1,41 vezes), β -glicosidase (7,48 vezes), β -xilosidase (2,72 vezes). O extrato de *R. composticola* FMG6 apresentou maiores atividades enzimáticas em relação ao extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756, nos substratos de xiloglucano tamarindo (26 vezes), pectina (3,29 vezes) e pNPC (1,38 vezes) (Figuras 24 e 25).

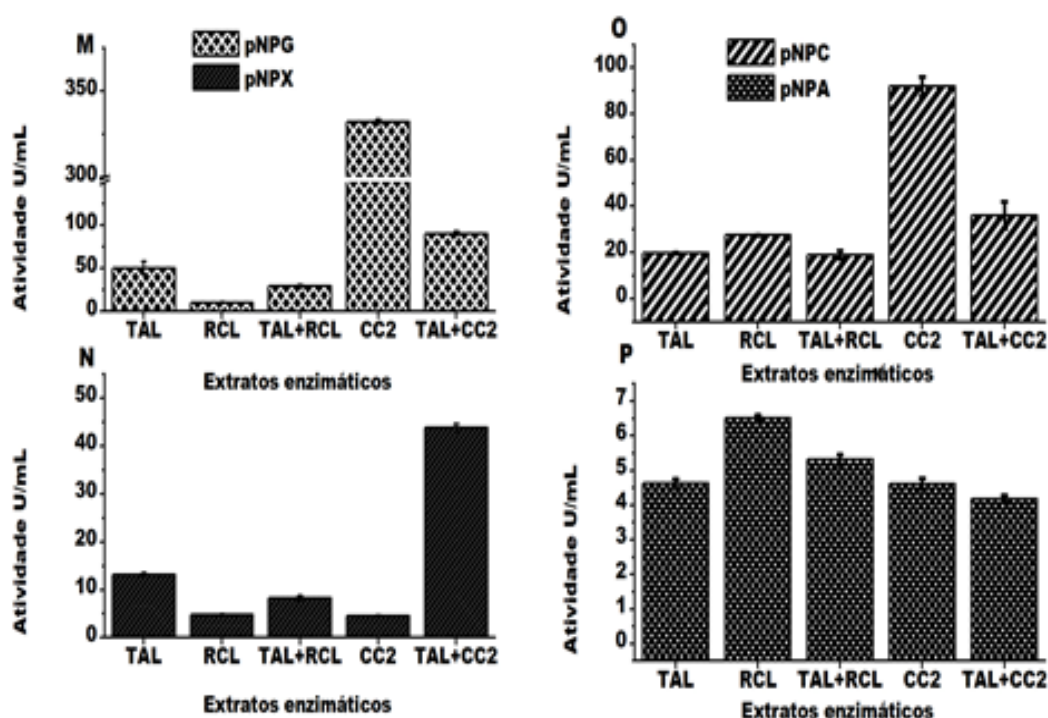
O coquetel comercial CELLIC® CTec2 obteve maiores atividades enzimática em relação ao extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 nos substratos de arabinana de beterraba (6,17 vezes), arabinana desramificada (2,17 vezes), arabinana linear (1,39 vezes), liquenano (1,19 vezes), xiloglucano de tamarindo (100 vezes), pectina (6,55 vezes), manana (6,50 vezes), avicel (12 vezes), CMC (7,45 vezes), pNPG (6,62 vezes) e pNPC(4,62 vezes). O extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 apresentou maiores atividades que o coquetel comercial CELLIC® CTec2 nos substratos de β -glucano (1,36 vezes), amido (1,78 vezes), xilana de faia (2,06 vezes), pNPX (2,87 vezes) e pNPA (1,004 vezes) (Figuras 24 e 25).

Figura 24. Atividade enzimática avaliada em painel de substratos comerciais. (U/mL) nos substratos: Arabinana de beterraba sacarina(A); Arabinana desramificada (B); Arabinana linear - arabinana de centeio (C); Xilana de madeira faia (D); Xiloglucano de tamarindo (E); Manana (F); Liqueenano (G); B-glucano de cevada (H); Avicel (I); Cmc (J); Pectina (K); Amido (L) dos extratos enzimáticos TAL - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (8FPU/g), RCL - *R. composticola* FMG6 (8FPU/g), TAL+RCL - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (4FPU/g) + *R. composticola* FMG6 (4FPU/g, CC2 - CELLIC® CTec2 (8 FPU/G) e TAL+CC2- *T. aurantiacus* CBMAI 756 (6 FPU/g) + CELLIC® CTec2 (2 FPU/g).



Fonte: Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 25. Atividade enzimática avaliada em painel de substratos comerciais e substratos cromogênico. Avaliação das atividades (U/mL) nos substratos: pNPG (M); pNPX (N); pNPC (O); pNPA (P), dos extratos enzimáticos TAL - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (8FPU/g), TAL+RCL - *T. aurantiacus* CBMAI 756 (4FPU/g) + *R. composticola* FMG6 (4FPU/g), RCL - *R. composticola* (8FPU/g), CC2 - CELLIC® CTec2 (8 FPU/G), TAL+CC2- *T. aurantiacus* CBMAI 756 (6 FPU/g) + CELLIC® CTec2 (2 FPU/g).



Fonte: Elaborado pelo autor.

As interações entre dois ou mais componentes hidrolíticos, produzindo um efeito total maior do que a soma dos efeitos dos componentes individuais, é definida como sinergia enzimática (VISSER, et al., 2013). Entre os extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6, a sinergia foi observada apenas na atividade enzimática de pectinase.

No entanto, o extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756, ao ser combinado com o extrato de *R. composticola* FMG6, apresentou algumas atividades enzimáticas aumentadas em relação aos extratos individuais. Assim, no extrato combinado de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6, as atividades enzimáticas de arabinanase, α -L-arabinofuranosidase, xilanase, liquenase, mananase, amilase, avicelase, CMCase e β -glicosidase foram maiores que no extrato individual de *R. composticola* FMG6 e ainda as atividades de xiloglucanase,

pectinase e celobiohidrolase foram maiores que no extrato individual de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (Figura 24e 25).

Portanto, o coquetel enzimático produzido pela combinação apresentou maiores atividades enzimáticas que os respectivos coquetéis individuais, para as atividades listadas anteriormente, possivelmente explicando a maior eficiência de hidrólise da combinação de extratos enzimáticos em relação aos extratos individuais.

Na combinação dos extratos enzimáticos de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com o coquetel comercial CELLIC® CTec2, a sinergia propriamente dita foi observada apenas na atividade enzimática de endo-xilanase, no substrato de xilana de madeira faia e β -xilosidase no substrato pNPX. No entanto, quando o extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 foi combinado ao coquetel comercial CELLIC®CTec2, as atividades enzimáticas dessa combinação foram maiores que a dos extratos individuais. Assim, no extrato combinado, as atividades enzimáticas de xilanase, xiloglucano, pectina, manana, endoglucanase, β -glicosidase e celobiohidrolase foram maiores que no extrato individual de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e as atividades de β -glucanase, amilase xilanase e β -xilosidase foram maiores que no coquetel comercial CELLIC® CTec2 (Figura 24 e 25). Estes aumentos podem explicar uma maior eficiência de hidrólise realizadas neste estudo pela combinação de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2 em relação aos seus respectivos extratos individuais.

T. aurantiacus é relado por Da Silva et al. (2005) por possuir um perfil enzimático mais hemicelulolítico que celulolítico. No painel enzimático realizado por este trabalho, sendo o mais completo até o momento, confirmamos o potencial desta cepa em ser mais hemicelulolítico que celulolítico. Além disso, este potencial hemicelulolítico fica evidenciado quando comparada a caracterização do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com a caracterização do coquetel celulolítico CELLIC® CTec2 (Figuras 24 e 25).

Apesar de CELLIC® CTec2 apresentar um perfil mais celulolítico que *T. aurantiacus* CBMAI 756 na mesma quantidade de FPU/g de substrato, observamos que o extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 foi mais eficiente que o coquetel CELLIC® CTec2 na liberação de glicose na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, e pré-tratado BD e *Slurry* (Figuras 21, 22 e 23). Portanto, além do potencial hemicelulolítico *T. aurantiacus* CBMAI 756 também é relatado por secretar enzimas celulolíticas eficientes em decompor celulose de materiais lignocelulósicos sendo indicado para o desenvolvimento atual de uma nova plataforma termofílica para a produção de celulases (GOMES; GOMES; STEINER, 1994; SCHUERG et al., 2017a).

No entanto, esse coquetel pode ser melhorado, pois quando em combinação com outros coquetéis como o de *R. composticola* FMG6 e CELLIC® CTec2, apresentou uma melhora na liberação de glicose (Figura 20A e 21A).

O extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, ao ser combinado com CELLIC® CTec2, proporcionou uma sinergia para a atividade de xilanases (Figura 24 D). Essa combinação pode ter contribuído para o aumento da produção de glicose quando os coquetéis são combinados. Hu et al. (2016) ao misturar proporções de coquetéis comerciais celulítico e hemicelulolítico, também observou um aumento do rendimento de hidrólise de licor de xilooligossacarídeos.

Quando as fibras de hemicelulose em materiais lignocelulósicos são removidas, ocorre o aumento da acessibilidade da celulose às celulasas. Assim, sugere-se a suplementação de hemicelulasas em misturas enzimáticas de celulasas para que ocorra o aumento do rendimento de glicose (VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010). Monte; Carvalho e Milagres, (2010) adicionou xilanases purificadas de *T. aurantiacus* em Celluclast (*Novozymes*), aumentando o rendimento de hidrólise e liberação de glicose.

Neste trabalho, o extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756, ao ser combinado com o de *R. composticola* FMG6, apesar de não ter proporcionado uma verdadeira sinergia entre as atividades de endo-xilanase, proporcionou um aumento dessa atividade, juntamente com o aumento de atividade de enzimas acessórias. Rakotoarivonina et al. (2012) relatam que enzimas acessórias auxiliam na hidrólise das ramificações de hemicelulose.

As combinações de extratos de fungos filamentosos diferentes formam coquetéis enzimáticos que possibilitam o aumento a eficiência de sacarificação enzimática da biomassa, permitindo a ação sinérgica de diferentes enzimas (SØRENSEN; PEDERSEN; MEYER, 2007). Todas as atividades enzimáticas encontradas pelo painel de substrato realizado para os extratos isolados de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e *R. composticola* FMG6 foram compatíveis com as enzimas detectadas nos estudos de proteômica dos secretomas destes fungos, obtidas no capítulo 2.

Este trabalho foi o primeiro a realizar uma caracterização para o extrato enzimático do potencial fungo termofílico *T. aurantiacus* por um painel de substrato diverso como apresentado nas Figuras 23 e 24. Além disso, para o coquetel enzimático *R.composticola* foi pela primeira vez caracterizado com as atividades enzimáticas produzidas por esta espécie.

6.5. CONCLUSÕES

Os extratos enzimáticos termofílicos de *T. aurantiacus* CBMAI 756, *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6 produzidos em material lignocelulósico altamente complexo, sacarificaram biomassa vegetal de alta recalcitrância como o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. O extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, ao ser combinado com os extratos de *R. emersonii* COQ e *R. composticola* FMG6, proporcionou maiores liberações de açúcares redutores totais na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, demonstrando o grande potencial de suas enzimas em melhorar o rendimento de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

A avaliação dos novos mixes de coquetéis enzimáticos obtidos pelas combinações de *T. aurantiacus* CBMAI 756 50% + *R. composticola* FMG6 50% e *T. aurantiacus* FMG6 75% + CELLIC® CTec2 25% demonstraram que esses foram mais eficientes na liberação de glicose e xilose que o coquetel comercial isolado CELLIC® CTec2 nos três tipos de bagaço de cana-de-açúcar avaliados neste estudo.

Este trabalho foi primeiro a estudar a aplicação do extrato enzimático de *R. composticola* induzido por material lignocelulósico como fonte de carbono para sacarificar bagaço de cana-de-açúcar. O arsenal enzimático termofílico de *R. composticola* demonstrou ser um completo coquetel enzimático apresentando atividades celulolíticas, hemicelulolíticas e enzimas acessórias, liberando mais glicose e xilose que o coquetel comercial com CELLIC® CTec2 em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Assim, este estudo ressalta o potencial das enzimas termofílicas e a importância da busca por novos coquetéis enzimáticos obtidos com combinações enzimáticas mais eficientes para a obtenção de maiores rendimentos sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e obtenção de açúcares fermentescíveis.

CAPÍTULO 4

Suplementação do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com as enzimas recombinantes endoglucanase (GH12) e lacase na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.

7.1. RESUMO

Um dos principais desafios para a produção comercial de biocombustíveis no Brasil tem sido o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos competentes em sacarificar bagaço de cana-de-açúcar. O coquetel enzimático termofílico de *T. aurantiacus* tem se destacado para desconstruir eficientemente a biomassa vegetal presente em agroresíduos. No entanto, algumas enzimas ativas em carboidratos (Cazymes) não foram detectadas por espectrometria de massas no arsenal enzimático do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756. Neste presente trabalho, foram selecionadas duas famílias de CAZymes como alvos importantes para melhorar os rendimentos de sacarificação desse potencial coquetel enzimático. As enzimas escolhidas foram uma endoglucanase pertencente à família GH12 de *Streptomyces* sp. e uma lacase CotA de *Bacillus subtilis*. Ambas enzimas foram produzidas de forma recombinante em bactéria e após testes em condições ótimas, mostraram-se compatíveis com o coquetel enzimático termoestável deste fungo. Para a suplementação do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 essas enzimas foram expressas e testadas em três concentrações. A sacarificação foi avaliada em dois bagaços de cana-de-açúcar, um deslignificado com pré-tratamento alcalino (BD) e outro obtido com pré-tratamento hidrotérmico sem a separação do licor gerado (*Slurry*), sendo a glicose e a xilose quantificadas pela técnica de HPLC. A endoglucanase GH12 mostrou-se eficaz em aumentar a liberação de glicose em 5%, apenas no bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento alcalino. Enquanto a enzima lacase CotA se destacou ao suplementar o coquetel enzimático sendo eficaz nos dois tipos de bagaços avaliados, atuando no aumento da produção tanto de glicose como xilose. O maior aumento na produção de glicose proporcionado pela suplementação de lacase foi de 27% no bagaço *Slurry* e de 9,42% para a produção de xilose. Os resultados obtidos foram os primeiros a melhorar o rendimento de sacarificação do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, com a suplementação de enzimas recombinantes ausentes em seu secretoma. Neste contexto, nossos estudos inovadores de suplementação adicionando enzimas recombinantes estratégicas para desconstrução da biomassa complexa da cana-de-açúcar, podem nortear para que *T. aurantiacus* se torne uma plataforma de produção e um coquetel de alto desempenho para obtenção de açúcares fermentecíveis e também demonstraram que essas enzimas são promissoras para engenheirar este fungo para futura produção comercial.

Palavras-chaves: *Thermoascus aurantiacus*, sacarificação, suplementação enzimática, endoglucanase GH12, lacase CotA

7.2. INTRODUÇÃO

Melhorar a eficácia dos extratos enzimáticos utilizados para hidrolisar materiais lignocelulósicos é essencial para a bioeconomia, visto que o custo das enzimas é um dos principais gargalos para a produção de etanol de segunda geração (E2G) (DELABONA et al., 2012; JØRGENSEN; OLSSON, 2006; SØRENSEN; TELLER; LÜBECK, 2011).

T. aurantiacus é um fungo amplamente relatado na literatura como uma promissora plataforma de enzimas que eficientemente desconstroem biomassa (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008; BRIENZO; CARVALHO, 2010; DA SILVA et al., 2005; MCCLENDON et al., 2012).

Como demonstrado no capítulo 2, o extrato enzimático do fungo termofílico *T. aurantiacus* CBMAI 756 se destacou pela maior produção de enzimas celulolíticas e xilanases quando comparado a potenciais espécies como *T. reesei*, *R. emersonii*, *R. composticola*. Além disso, esta espécie também se destacou no capítulo 3 pelos maiores teores de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, comparado a outros extratos enzimáticos produzidos no mesmo meio de cultura testado. Até mesmo em comparação ao coquetel comercial CELLIC® CTec2, o arsenal enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 recebeu destaque, obtendo maior liberação de açúcares redutores na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, seu extrato enzimático quando combinado com outros coquetéis potenciais proporcionou um aumento na liberação açúcares fermentescíveis em comparação aos extratos não combinados.

No entanto, o fungo *T. aurantiacus* possui um genoma menor e uma quantidade inferior de CAZymes putativas anotadas quando comparado a outros potenciais fungos lignocelulósicos importantes como *T. reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Myceliophthora thermophila* e dentre outras renomadas espécies fúngicas (<http://genome.jgi.doe.gov/Theau1/Theau1.home.html>).

Ao realizar a análise de proteômica do secretoma de *T. aurantiacus* crescido em *Switchgrass* AFEX-SG, McClendon et al. (2012) relatou que as proteínas majoritárias em destaque no secretoma foram identificadas como GH7, GH5, AA9 e GH10.

No capítulo 2, o secretoma enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, produzido em fermentação submersa em resíduo lignocelulósico (1:1:1; palha de milho, farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar) apresentou a identificação de 30 CAZymes, classificadas em 25 famílias. Apesar desse extrato ser mais complexo do que o do extrato enzimático produzido por McClendon et al., (2012), o coquetel enzimático do fungo *T. aurantiacus* continua sendo notoriamente simples, mesmo com sua eficiência evidenciada.

O secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756, ao ser comparado ao de outros fungos como os de importância industrial na produção de enzimas, *T. reesei* e *A. niger* descritos por Borin et al., (2015), demonstra menor variabilidade de enzimas atuantes em carboidratos. As CAZymes identificadas no secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI 756, no capítulo 2 foram classificadas nas famílias: GH7, GH5, GH10, GH3, GH67, GH17, CE4, GH15, CE16, CE1, PL3, GH79, GH51, GH65, AA3, AA9, GH27, GH16, GH28, GH18, GH31, GH37, GH35, GH25 e GH28.

No capítulo 3, o extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756, quando suplementado em concentrações específicas dos coquetéis de *R. composticola* FMG6 e CELLIC® CTec2, apresentou melhorias na liberação de glicose na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Isto indica que, apesar do coquetel de *T. aurantiacus* ser relatado como eficiente, este ainda pode ser melhorado por adição de enzimas recombinantes adequadas.

Em adição, o painel de substratos obtido no capítulo 3 demonstrou que maiores atividades enzimáticas foram quantificadas para os extratos resultantes das combinações de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + *R. composticola* FMG6 e *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2 comparado com o extrato individual de *T. aurantiacus* 756. Nesse contexto, em relação ao coquetel isolado de *T. aurantiacus* CBMAI 756 as atividades de arabinanase, α -L-arabinofuranosidase, xilanase, liquenase, mananase, amilase, avicelase, CMCase e β -glicosidase foram maiores para a combinação de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + *R. composticola* FMG6. Ainda em relação ao coquetel isolado de *T. aurantiacus* CBMAI 756 as atividades de xilanase, xiloglucanase, pectinase, mananase, endoglucanase, β -glicosidase e celobihidrolase foram maiores para a combinação de *T. aurantiacus* CBMAI 756 + CELLIC® CTec2. Assim, esses resultados indicam que a adição de enzimas para essas atividades (descritas serem aumentadas nas combinações com o extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756) pode melhorar o rendimento de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.

Neste cenário, alguns alvos foram considerados importantes para serem testados na suplementação desse promissor coquetel, visto que estratégias de engenharia genética para a melhoria desta maquinaria estão em fase de desenvolvimento, como relatado por (SCHUERG et al., 2017a).

7.2.1 Endoglucanase da família 12 (GH12) como enzima potencial para a suplementação do extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756

Apesar de *T. aurantiacus* ser um fungo predominante produtor de hemicelulases é reportado na literatura por produzir elevadas quantidade de celulasas. No entanto, sua mistura

de enzimas atuantes em celulose apesar de eficiente é notavelmente simples, consistindo em celobiohidrolase GH7, endoglucanase GH5, monoxigenases AA9 e β -glucosidase GH3 (SCHUERG et al., 2017a).

No genoma de *T. aurantiacus* depositado no JGI Fungi Portal (Joint Genome Institute) (<http://genome.jgi.doe.gov/Theau1/Theau1.home.html>), dentre as notações para CAZymes, não são encontrados genes que codificam endoglucanases da família GH12.

Além disso, não foram encontrados na literatura, estudos sobre endoglucanases pertencentes a família GH12 que fossem expressas, caracterizadas e identificadas em cepas de *T. aurantiacus*. Um levantamento realizado no banco de dados de CAZY (<http://www.cazy.org/>) demonstrou que as GH pertencentes a família 12 são amplamente presentes nos genomas de fungos filamentosos como demonstrado na Figura 26. Até o presente estudo, nenhum gene codificante de GH12 foi encontrado em cepas de *T. aurantiacus*.

Figura 26. Espécies de fungos com genes preditos para CAZymes pertencentes da família 12. Levantamento realizado no banco de dados de CAZY (<http://www.cazy.org/>).

Espécies de fungos relacionadas pelo CAZY contendo genes codificantes de GH12		<i>Penicillium oxalicum</i> *
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Fomitopsis palustris</i>	<i>Penicillium rubens</i> Wisconsin
<i>Acremonium chrysogenum</i> *	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>Aspergillus fischeri</i> *	<i>Fusarium fujikuroi</i> *	<i>Podospira anserina</i>
<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Fusarium graminearum</i> *	<i>Polyporus arcularius</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	<i>Fusarium striatum</i>	<i>Postia placenta</i>
<i>Aspergillus kawachii</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	<i>Rhizomucor miehei</i> *
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Humicola grisea</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i> *
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Hypocrea orientalis</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *
<i>Aspergillus niveus</i>	<i>Hypocrea schweinitzii</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Hypocrella siamensis</i> *	<i>Talaromyces amestolkiae</i> *
<i>Bipolaris zeicola</i>	<i>Lentinula edodes</i> *	<i>Thanatephorus cucumeris</i>
<i>Botrytis cinerea</i> *	<i>Leptosphaeria maculans</i> *	<i>Thermothelomyces thermophila</i> *
<i>Aspergillus usarii</i> *	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i> *	<i>Thielavia terrestris</i> *
<i>Chaetomium brasiliense</i>	<i>Lichtheimia ramosa</i> *	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Chaetomium thermophilum</i> *	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Trichoderma koningii</i>
<i>Chrysosporium lucknowense</i> *	<i>Malbranchea cinnamomea</i> *	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>
<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Memnoniella echinata</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> *	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Emericella desertorum</i>	<i>Penicillium decumbens</i>	<i>Volvariella volvacea</i> *

* enzimas da classe GH12 estruturas resolvidas e depositadas no banco PDB

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como relatado no capítulo 3, o extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756, ao ser combinado ao coquetel CELLIC® CTec2, considerados celulolíticos, apresentou um aumento de liberação de glicose em relação ao extrato isolado de *T. aurantiacus* CBMAI 756. Desse modo, para a hidrólise eficiente da celulose é essencial a ação combinada e sinérgica de

diferentes tipos de GH capazes de hidrolisar as ligações covalentes que conectam unidades de glicose na fibra de celulose (YEOMAN et al., 2010).

A cepa 11AG8 de *Streptomyces* sp. apresentou uma celulase com atividade em carboximetilcelulase (CMCase) em uma ampla faixa de pH (5-10), sendo o pH ótimo entre 6 e 8 (VAN SOLINGEN et al., 2001). Esta enzima é, portanto, mais termooestável que a Cel12A de *T. reesei*, com uma temperatura de transição (T_m) de 12,6 °C maior (SANDGREN et al., 2003). T_m é a temperatura no qual 50% da enzima encontram-se na forma desenovelada ou na forma enovelada. Os autores sugerem que esta estabilidade térmica fez de GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 uma ótima candidata para aplicações industriais e modelos para estudo. Este trabalho selecionou esta enzima para a realização de testes de suplementação de coquetéis termofílicos.

Visto que a mistura do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com o extrato do coquetel comercial celulolítico CELLIC® CTec2 favoreceu a liberação de glicose, e há ausência das importantes celulasas GH12 no genoma da espécie *T. aurantiacus*, selecionamos a endoglucanase recombinante da família GH12 cepa de 11AG8 de *Streptomyces* sp. para suplementar o coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 576.

Nesse contexto, a estabilidade térmica das enzimas no gênero de *Streptomyces* e a importância de endoglucanase da cepa de 11AG8 de *Streptomyces* sp. pela eficiência em hidrolisar celulose em altas temperaturas, fez com que esta enzima se tornasse o um alvo potencial para melhorar o arsenal celulolítico de *T. aurantiacus* CBMAI 576.

7.2.2. Lacase (CotA) como enzima potencial para a suplementação do extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756

A composição e a quantidade de lignina são grandes responsáveis pela recalcitrância da biomassa destinada a sacarificação (PAPA et al., 2012; STUDER et al., 2011). As lacases desempenham um importante papel na decomposição da madeira (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009). Lacases são oxidases que catalisam a redução do oxigênio molecular em água pela transferência de elétrons derivados da oxidação. Essas moléculas abrigam um sítio ativo com quatro átomos de cobre em sua estrutura (CLAUS, 2004; THURSTON, 1994).

Apesar dos fungos basidiomicetos serem considerados responsáveis pela podridão branca da madeira e os mais eficientes na degradação da lignina (KENT KIRK, 1987; ROTH; SPIESS, 2015).

Genes para lacases estão descritos no genoma de *T. aurantiaus*, depositado no JGI *Fungi Portal* (<http://genome.jgi.doe.gov/Theau1/Theau1.home.html>). A atividade para lacase

também é relatada para esta espécie. Dar e Phutela, (2015) descrevem a otimização da produção de lacase por *T. auranticus* MTCC 375 em fermentação sólida com substrato palha de arroz como e polpa digerida de biogás. No entanto, na análise proteômica do secretoma de *T. aurantiacus* CBMAI756 deste estudo, não foi identificada nenhuma proteína com atividade para lacase, além de também não ter sido detectado atividade para esta enzima no substrato de ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS).

Assim, no contexto da importância de lacase na sacarificação de biomassas, na ausência desta enzima no genoma, no secretoma do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e das condições termoestáveis da enzima CotA de *Bacillus subtilis*, esta proteína tornou-se uma candidata para ser avaliada na suplementação do coquetel para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com enzimas importantes na sacarificação de biomassas complexas, como o bagaço de cana-de-açúcar. Para isto, enzimas ausentes no secretoma deste fungo, como uma endoglucanase (GH12) (proveniente de *Streptomyces*) e uma lacase (proveniente de *Bacillus subtilis*), foram avaliadas em três concentrações diferentes para aumentar a liberação de açúcares fermentecíveis.

7.3 MATERIAIS E MÉTODOS

7.3.1 Produção do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756

O extrato do fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756 foi produzido para as avaliações de sacarificação do seu arsenal enzimático suplementado com as enzimas recombinantes GH12 e lacase. Este extrato foi produzido nas mesmas condições em que foi avaliado nos estudos de proteômica do capítulo 2.

Para isto, foi realizado um pré-inóculo em meio PDA sólido, cultivado por 240 horas a 50 °C para obter uma suspensão de esporos a 10^5 por mL. Os esporos foram inoculados um meio contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,5 g/L); KH_2PO_4 (3,0 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L); CaCl_2 (0,5 g/L), Tween 80 (10,0 mL) e 2% (w/v) de uma mistura de palha de milho, farelo de trigo e bagaço de cana (1:1:1), todos *in natura*, com pH ajustado para 5,0. A fermentação ocorreu por 240 horas a 50°C em rotação de 100 rpm. O extrato enzimático foi filtrado e concentrado 20 vezes com o concentrador tangencial com uma membrana com um corte de 10 kDa.

O extrato enzimático concentrado foi quantificado quanto ao teor de proteínas solúveis totais com o método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories).

7.3.2 Produção das enzimas recombinantes

Para a produção das enzimas selecionadas para a suplementar o coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, o gene para a endoglucanase GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG (denominada de GH12ST) ligado ao vetor de expressão pET28a(+) foi sintetizadaos pela empresa GenScript e o gene da lacase CotA de *Bacillus subtilis* ligado ao vetor de expressão pET28a(+) foi cedido em colaboração. Ambos foram transformados e expressos em linhagens *E. coli* pRARE2. Colônias transformadas foram cultivadas em um pré-inóculo de meio de cultura Luria-Bertani (LB) líquido com adição de canamicina (34 µg/mL) e cloranfenicol (40 µg/mL), no volume de 10 mL, sob agitação de 250 rpm, incubados a 37 °C *overnight*.

Em seguida, para a enzima endoglucanase GH12ST, nas mesmas condições, o pré inóculo foi cultivado em 1 litro de LB até atingir a densidade ótipca de 0,6 (DO₆₀₀). Em seguida, com a indução de 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), a proteína recombinante foi expressa por 4 horas.

Para a enzima lacase CotA, no momento da indução, foi adicionado ao meio 0,25 mM de CuSO₄ e a temperatura foi reduzida para 25°C durante as 4 horas de incubação. As condições microaeróbicas foram alcançadas desligando a rotação do agitador. Após 16 horas de crescimento sob estas condições, as células foram colhidas por centrifugação. As células para as duas expressões foram centrifugadas a 7000 x *g* por 30 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado congelado a – 20°C.

Para a lise celular, o precipitado foi ressuspendido em 20 mL de tampão composto por imidazol 20 mM, NaCl 300 mM, fosfato monobásico 25 mM e fosfato dibásico 25 mM pH 7,4, 4 Mm de PMSF, 1% Triton X-100, 100 mg/mL de lisozima, incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Cada lisado celular foi sonicados e centrifugados a 10.000 x *g* durante 40 min a 4°C.

7.3.3 Purificação por cromatografia por afinidade (IMAC)

A purificação das enzimas liberadas no sobrenadante foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefarose (IMAC *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) utilizando purificador AKTA FPLC (GE Healthcare®). A purificação foi realizada com um gradiente do tampão composto de imidazol 500 mM, NaCl 300 mM, fosfato dibásico 25 mM e fosfato monobásico 25 mM em pH 7,4.

As amostras foram consideradas puras após análise via eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) (SCHAGGER; GEBHARD, 1987).

7.3.4 Atividade enzimática

A atividade enzimática da enzima lacase foi mensurada em tampão citrato pH 4.8 utilizada com substrato oxidação do ABTS, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) 1 mM (Sigma-Aldrich) com leitura a 420 nm conforme descrito por Bourbonnais et al. (1997).

Para a endoglucanase GH12 as atividades enzimáticas utilizaram os substratos de carboximetilcelulose (CMC), Avicel (Sigmacell – Sigma®), Liquenano e β -glucano de cevada (*Megazyme*). Estes ensaios foram realizados em microrreações conforme descrito por Squina et al., 2009, com análise dos açúcares redutores liberados em 10 minutos pelo método do DNS (Miller, 1959).

7.3.5. Caracterização bioquímica, valores ótimos de pH e temperatura

A caracterização de temperatura e pH ótimo da lacase CotA foi realizado por Ribeiro et al. (2011). Para a endoglucanase GH12 foram realizados os ensaios para determinar pH e temperatura ótimos de atuação no substrato β -glucano de cevada 0,5%, substrato em que melhor atuou.

Para determinar o pH ótimo de atividade enzimática da endoglucanase GH12, foram utilizados varios sistemas de tampões: citrato de sódio e ácido cítrico e 0,1 M (pH 3,5 a 6,5), fosfato dibásico e fosfato monobásico 0,1 M (pH 7,0 a 8,0), tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) e glicina-NaOH 0,1 M (pH 9 e 9,5). A temperatura para os ensaios de pH ótimo foi de 60 °C, por ser a temperatura ótima do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

Os ensaios enzimáticos para determinar a melhor temperatura de atuação da enzima foi realizada entre 40 e 90 °C. As reações foram realizadas em triplicata, e os açúcares redutores foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959).

7.3.6. Caracterização biofísica parcial

A caracterização da enzima lacase CotA foi realizada nos estudos de Furtado et al. (2013) e Ribeiro et al. (2011).

Para a enzima recombinante endoglucanase GH12, foram realizadas análises de dicroísmo circular com o objetivo de avaliar a sua estrutura secundária e calcular a temperatura de desnaturação térmica (T_m).

7.3.6.1 Estudo do perfil da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)

Os experimentos de dicroísmo circular CD foram feitos utilizando espectropolarímetro Jasco® 810 (Jasco International) acoplado a um sistema de controle de temperatura peltier, em cubetas de quartzo com 1 mm de caminho ótico, com a concentração da enzima variando de 0,2 a 0,3 mg/mL.

Para determinar o perfil de estruturas secundária os espectros foram obtidos no intervalo de 195 a 260 nm na temperatura de 20 °C em tampão e pH ótimos do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, citrato de sódio 0,20 mM a pH 4,8. Para o cálculo da temperatura de desnaturação térmica (T_m), foi realizado o monitoramento da elipticidade residual molar em 220 nm durante um gradiente de 20 a 100 °C, com aquecimento de 1 °C por minuto. As análises de CD foram realizadas em tampão citrato de sódio 20 mM, pH 4,8.

7.3.7. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados

Dois tipos de bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados para esses ensaios de sacarificação com o coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com enzimas recombinantes. Estes bagaços foram obtidos em boração com o grupo de estudos de pré-tratamentos físico-químicos do Centro de Tecnologia do Bioetanol (CTBE) atual LNBR (Laboratório Nacional de Biorrenováveis).

O pré-tratamento alcalino que consistiu em um aquecimento de 130 °C durante 30 min com 15 % NaOH m/v originou o bagaço denominado BD com composição de 58,6 % de celulose; 22,1 % de hemicelulose; 8,8 % de lignina, 10 % de cinzas e com umidade de 8,27%. O pré-tratamento hidrotérmico, sem a separação do licor gerado consistiu em um aquecimento de 190 °C por 10 minutos gerando o bagaço *Slurry* com a composição de 57,52% $\pm$ 0,40 % de glicose, 28,50% $\pm$ 0,24 de lignina e grupo acetil de 0,02%.

7.3.8. Suplementação de coquetéis enzimáticos fúngicos por enzimas recombinantes microbianas para a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.

7.3.8.1. Sacarificação enzimática

Para os ensaios de sacarificação enzimática a dosagem total de proteínas utilizada por reação foi de 10 mg por grama de substrato seco. As reações controles apresentaram apenas proteínas do fungo (10 mg/g), ou seja, sem adição de enzima recombinante.

Para as reações de hidrólise suplementadas com as enzimas recombinantes purificadas, a quantidade de proteína total do coquetel fúngico (10 mg/g) foi substituída por 0,1, 0,5 e 1 mg de proteína recombinante por grama de substrato (bagaço de cana-de-açúcar. Essa quantidade de proteína recombinante representa 1%, 5% e 10%, respectivamente do total de proteínas de cada ensaio de hidrólise.

O teor de sólidos utilizado na sacarificação foi de 10% (m/m). Os ensaios foram tamponados respeitando o peso de 10 gramas (aproximadamente 10 mL) em frascos de vidro tipo *schott* de 25 mL, que foram incubados a 60 °C com agitação a 200 rpm por 96 horas, em duplicata. As coletas ocorreram a cada 24 horas e respeitaram até 10% do peso do total da reação. Cada ponto coletado foi pesado e diluído 10 vezes pelo valor do peso da amostra coletada. Após a adição de água as amostras foram centrifugadas a 4 °C, 14.000 x *g* por 10 minutos. Os sobrenadantes foram congelados até o momento em que foram analisados por HPLC.

Os resultados de glicose e xilose obtidos em cada concentração de enzima foram comparados pelo teste T de *Student* ao nível de probabilidade de 0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Prism 6 (GraphPad Prism, La Jolla, CA, EUA).

7.3.9. Quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Os ensaios de quantificação por HPLC foram realizados em colaboração com o setor de química analítica do CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol) LNBR (Laboratório Nacional de Biorrenováveis). A xilose e a glicose liberada nos ensaios de sacarificação foram determinadas por Cromatografia de Troca Iônica de *Alta Performance* (High Performance Anion Exchange Chromatography) em um sistema de cromatografia Dionex ICS-3000, com a detecção amperométrica pulsada (PAD), equipado com coluna de separação CarboPac PA-1 (4 x 250 mm). O tempo de retenção e a concentração de soluções foram comparados como padrões de glicose e xilose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Os

monossacarídeos foram eluídos a uma vazão de 0,5 mL/min com o gradiente de 0-500 mM de acetato de sódio em 100 mM de NaOH.

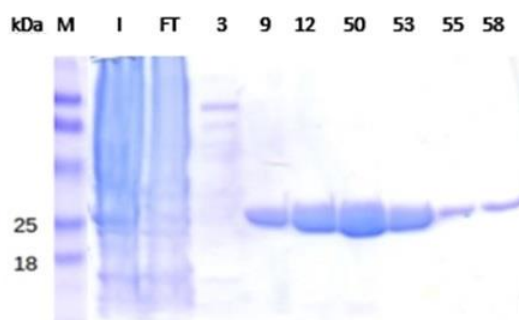
7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.4.1. Expressão e purificação da GH12 e lacase CotA

Para avaliar a endoglucanase recombinante de *Streptomyces* (GH12ST) e a lacase CotA na suplementação do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, os vetores de expressão pET28a(+)/GH12 e pET28 a(+)/CotA foram transformados e expressos em cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) por choque térmico.

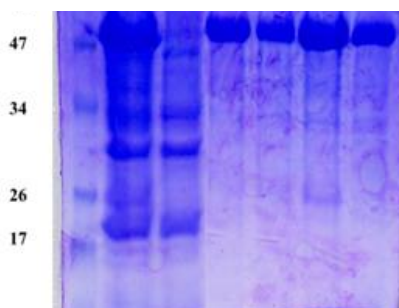
Após a expressão e purificação da endoglucanase GH12 (23 kDa) e da lacase CotA (68 kDa) estas foram analisadas em gel de SDS-Page 12%, demonstrando um alto grau de pureza (Figura 27 e 28, respectivamente).

Figura 27. Análise em gel SDS-PAGE do grau de pureza da GH12ST. M: marcador de massa molecular em kDa; I: amostra injetada na coluna de purificação; FT: fração não retida pela coluna ou *flow through*; 9 a 58: frações da cromatografia correspondentes à enzima GH12ST de *Streptomyces* sp. 11AG8.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28. Análise em gel SDS-PAGE do grau de pureza da lacase CotA. M: marcador de massa molecular em kDa; I: amostra injetada na coluna de purificação; Fração não retida pela coluna ou *flow through*; 1 a 4 frações da cromatografia correspondente a enzima lacase CotA.



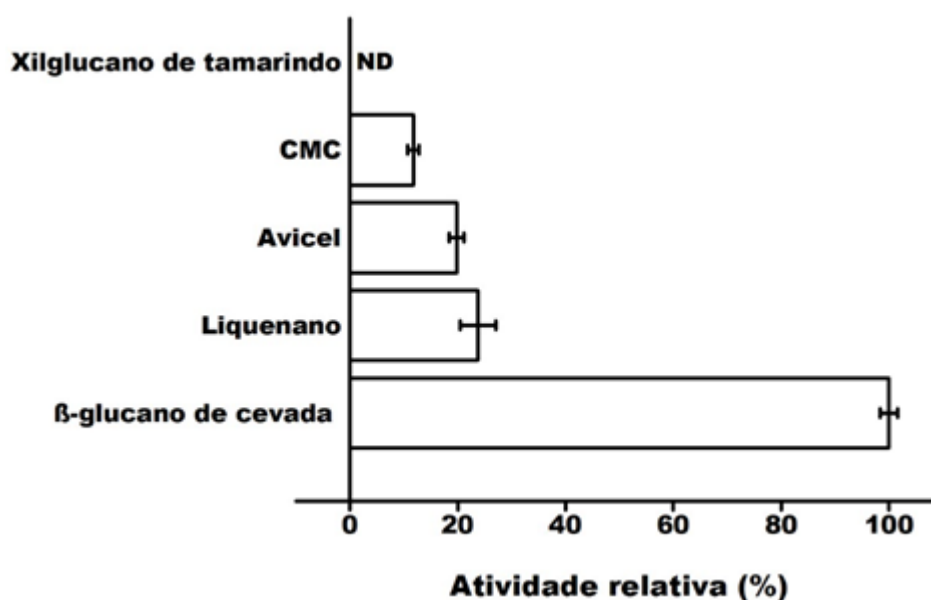
Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4.2. Caracterização bioquímica das enzimas recombinantes

A lacase CotA de *Bacillus subtilis* descrita por obteve o mecanismo catalítico e a estrutura tridimensional caracterizados por Martins et al., (2002b). Furtado et al. (2013) caracterizaram as condições ótimas de reação desta enzima em substrato ABTS, sendo 80 °C a temperatura ótima de um intervalo temperatura de 60 a 85 °C e o pH de maior atividade 4,5.

A família GH12 possui enzimas com diversos tipos de atividades. Por este motivo, o substrato de maior atividade foi determinado para a enzima endoglucanase GH12ST, antes dos ensaios de condições ótimas serem realizados, conforme demonstrado na Figura 29. Na família GH12, são encontradas enzimas endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.151), endo-transglicosilases (EC 2.4.1.207), endo- β -1,3-1,4glucanases (EC 3.2.1.73) e endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4) (CALZADO et al., 2016; SANDGREN et al., 2003; TISHKOV et al., 2013).

Figura 29. Painel de substratos para avaliação da especificidade da endoglucanase GH12 recombinante de *Streptomyces* sp. 11AG8. Os substratos avaliados a 0,5 % (m/v) foram: Xiloglucano de tamarindo, CMC, avicel, liquenano e β -glucano de cevada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste experimento foram quantificados os açúcares redutores liberados pela atividade enzimática relativa. Estas reações foram realizadas em tampão citrato de sódio pH 4.8 a 60 °C, condições ótimas de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar para o coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

No substrato de β -glucano de cevada, ocorreu a maior atividade encontrada para a endoglucanase GH12ST. Esse substrato é um polissacarídeo muito similar à celulose normalmente hidrolisada por endoglucanase, sendo formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e β -1,3 na proporção de 2:1. Além do substrato de β -glucano, foi verificado que a enzima apresentou 23,75%, 19,82%, e 11,81 % de atividade enzimática relativa sobre os polissacarídeos liquenano, avicel e CMC, respectivamente.

A menor atividade enzimática observada foi em liquenano. Para substrato de xiloglucano de tamarindo, não foi detectada atividade enzimática (ND). As endoglucanases da família GH12 geralmente atraem atenção devido à sua maior atividade de endo- β -1,3/1,4-glucanase (DAMÁSIO et al., 2014; ZHANG et al., 2011a). Essas enzimas são consideradas importantes na despolimerização de celulose derivada de plantas, sendo ativas tanto em celulose cristalina quanto celulose hidrolisada, um processo de grande importância para conversão das biomassas vegetais (HIRAS et al., 2016). Dias, (2013) verificaram em *Aspergillus terreus* que a endoglucanase I apresentava 100 %, 45 %, 8,6 %, e 1,4 % de atividade relativa em β -glucano, xiloglucano de tamarindo, glucomanana e CMC, respectivamente.

Gloster et al. (2007) também estudaram a especificidade da GH12 da linhagem *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 para diferentes polissacarídeos e verificou que essa enzima apresentava 100 %, 39 %, 18 % e 8 % de atividade relativa para os substratos de xiloglucano de tamarindo, CMC, glucomanana e β -glucano de cevada, respectivamente.

A multi-especificidade de endoglucanase pertencentes a família GH12 é ideal para ser aplicada no desenvolvimento de coquetéis enzimáticos eficientes e micro-organismos geneticamente modificados, visando à utilização destes na sacarificação de biomassas vegetais.

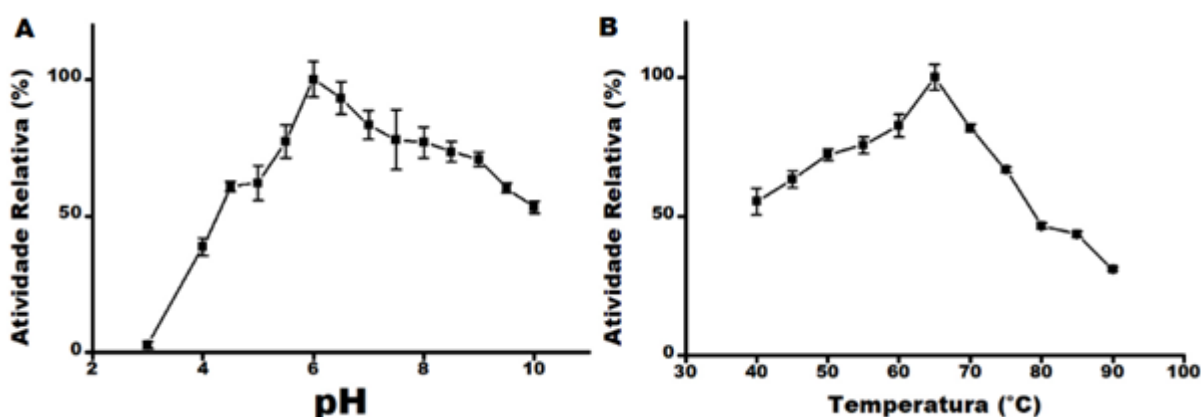
Os efeitos do pH e temperatura na atividade da endoglucanase GH12ST de *Streptomyces* sp. 11AG8 foram avaliados por Van Solingen et al. (2001) em carboximetilcelulose obtendo uma faixa ótima de pH 5–10 a 50 °C. No presente estudo, os efeitos de pH e temperatura foram avaliados no substrato de β -glucano de cevada, substrato este de maior atividade para esta enzima, não testado por Van Solingen et al. (2001).

7.4.2.1 Avaliação de atividade nas condições de pH e temperatura ótimos para GH12 em β -glucano de cevada.

Usando o substrato de β - glucano de cevada, foram avaliados os efeitos do pH e da temperatura na atividade da GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 os resultados obtidos estão apresentados na Figura 30.

A enzima estudada mostrou-se ativa em pH entre 4,0 a 10 sendo em pH 6 a sua atividade máxima. em tampão citrato pH 4.8 a enzima manteve 61,9% de atividade relativa (Figura 30A). A temperatura da atividade máxima da enzima foi constatada em 65 °C. Nas temperaturas de 60 e 70 °C, a enzima apresentou cerca de 80% de atividade relativa (Figura 30B).

Figura 30. Efeito do pH (A) e temperatura (B) na atividade enzimática de GH12 recombinante de *Streptomyces* sp. 11AG8. Avaliações realizadas no substrato 0,5% de β -glucano de cevada. Avaliações realizadas no substrato 0,5% de β -glucano de cevada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4.3. Estudo do perfil da estrutura secundária por dicróismo circular (CD) de GH12

No presente trabalho, o dicróismo circular foi utilizado para determinar desnaturação térmica da estrutura secundária da enzima recombinante GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 no pH ótimo de hidrólise do extrato de *T. aurantiacus* (tampão acetato pH 4.8).

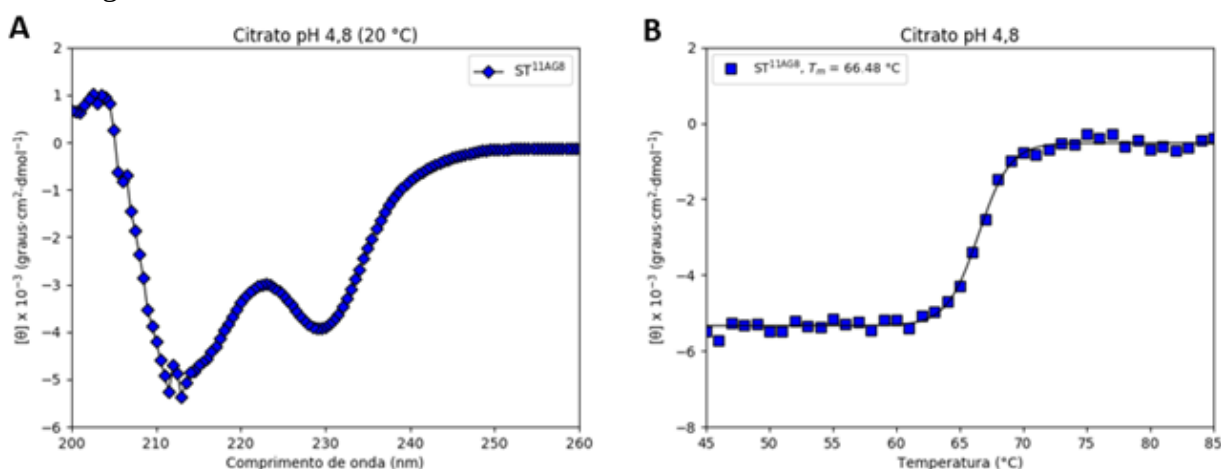
Sandgren, Stahlberg e Mitchinson, (2005) analisaram a GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 em comparação a GH12 de *T. reesei*, *Humicola grisea* e *Hypocrea schweinitzii* em tampão de acetato de amônio pH 8 por dicróismo circular. Estes autores observaram que as proteínas GH12 possuem um alto teor de folhas β . Sandgren et al., (2003) realizaram os experimentos de desnaturação térmica também em tampão acetato de amônio pH 8 e detectou um Tm de 66,8 °C.

O perfil da estrutura secundária das enzimas GH12 foi obtida com base nos espectros adquiridos (Figura 31A). O perfil de CD mostrou dois mínimos e um mais acentuado próximo a 220 nm, como característico de proteínas com predominância em folhas β (Sandgren et al., 2003). A enzima apresentou perfil característico de proteínas com alto teor de folhas β , como é o caso das GH12. Esse perfil foi muito semelhante ao perfil descrito por Sandgren, Stahlberg e Mitchinson, (2005), que testaram a mesma enzima em tampão acetato de amônio pH 8 para as análises do perfil de CD.

A técnica de CD também foi utilizada para monitorar as mudanças na estrutura secundária das enzimas estudadas durante o aquecimento da amostra e para estimar a temperatura de transição na fração desenovelada (T_m) em tampão citrato de sódio pH 4,8. Nos espectros de CD coletados, alterações significativas ocorreram em temperaturas superiores a 60 °C, indicando a desnaturação da enzima (Figura 31B).

A partir da curva de desnaturação térmica, o T_m estimado foi de 66,48 em tampão citrato pH 4,8, muito próximo do T_m obtido por de Sandgren et al.(2003) em o tampão acetato de amônio pH 8 (66,8). Este valor está de acordo com os dados experimentais obtidos anteriormente na determinação da temperatura ótima da enzima no substrato de β -glucano, que indicava a perda da atividade enzimática em temperaturas acima de 65 °C (Figura 30B).

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, elipticidade molar a 220 nm. durante gradiente térmico de 20 a 85 °C, 1 °C minuto, obtendo um T_m de 66,48 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4.4. Suplementação do coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 e lacase CotA recombinantes

Com os resultados obtidos de pH, temperatura, desnaturação térmica e dicroísmo circular foi possível concluir que a enzima recombinante GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 pode atuar nas condições ótimas de temperatura e pH do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (60 °C e tampão citrato pH 4.8). Além disso, esta enzima demonstrou ser uma candidata para aumento da atividade sobre β -glucano e CMC, consequentemente apresentando um potencial em aumentar a liberação de glicose na hidrólise do coquetel de *T. aurantiacus*.

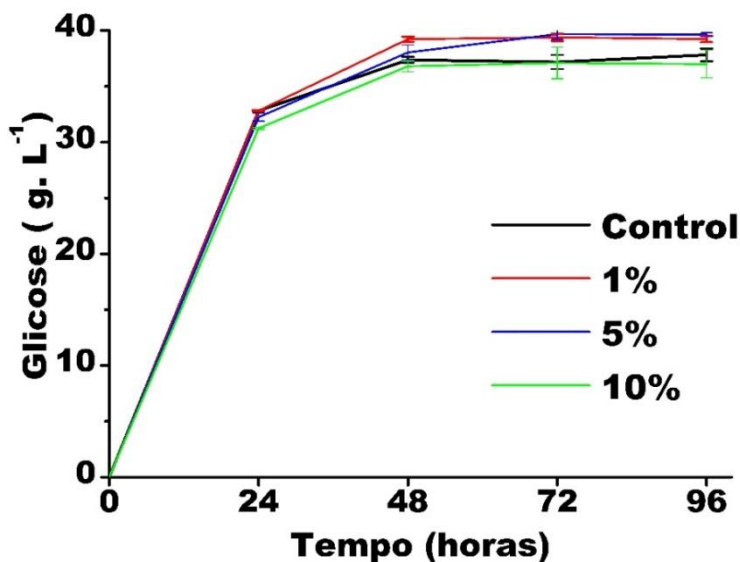
Os resultados obtidos por Martins et al. (2002b) e Furtado et al. (2013) descrevem que a enzima lacase CotA também atuar nas condições ótimas de temperatura (60 °C) e pH (4.8) do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756. A partir disso, a dosagem de proteína total utilizada para a hidrólise dos dois tipos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foi de 10 mg por grama (g) de massa seca de substrato. As enzimas recombinantes lacase CotA e GH12 *Streptomyces* sp foram utilizadas para suplementar na proporção de 1%, 5% e 10 % da quantidade de enzima total (10 mg/g) do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

Assim as amostras, controles 1%, 5% e 10% representavam 10 mg/g, 9,9 mg/g, 9,5 mg/g e 9 mg/g de proteínas do coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756, respectivamente e 0 mg/g, 0,1 mg/g 0,5 mg/g e 1 mg/g de proteínas recombinantes, respectivamente.

7.4.5. Liberação de glicose e xilose na sacarificação dos bagaços de cana-de-açúcar BD com o coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756, suplementado com a endoglucanase pertencente à família GH12

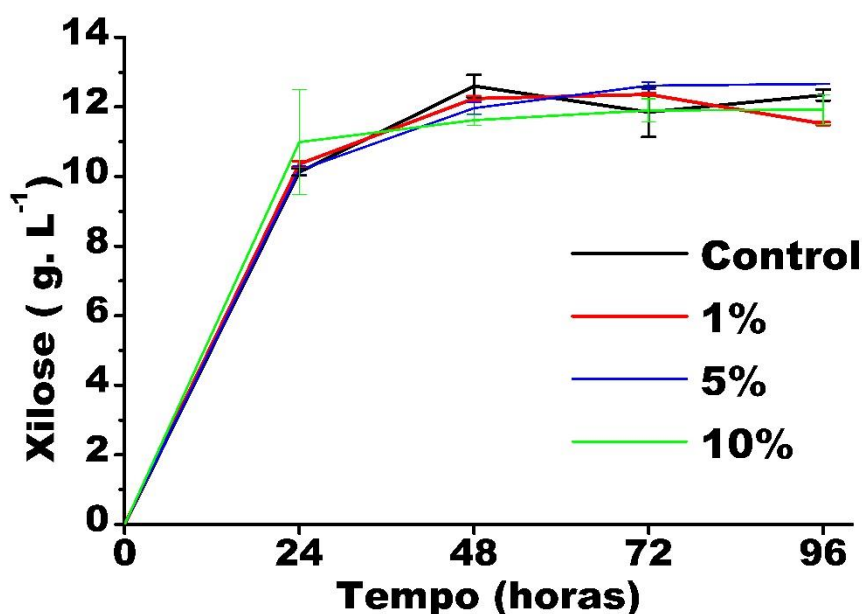
A enzima GH12, ao suplementar o extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, promoveu aumento na liberação de glicose na sacarificação do bagaço BD. O maior aumento significativo ocorreu no tempo de 48 horas na suplementação com 1% da endoglucanase GH12 ($P < 0,05$). Este ponto com adição de GH12 na proporção de 1% da proteína em relação ao coquetel representou um aumento de 5% na liberação de glicose, que passou de 37,3 g/L (controle) para 39,2 g/L (Figura 32). Em relação a liberação de xilose no bagaço BD, em nenhuma das concentrações de GH12 avaliadas nos tempos propostos ocasionou aumentos significativos ($P < 0,05$) (Figura 33).

Figura 32. Liberação de glicose, em bagaço BD (10% m/m), pelo coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 em três concentrações de proteínas totais (1%, 5%, 10%). A sacarificação ocorreu durante 96 horas em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. O experimento foi realizado em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33. Liberação de xilose (g/L), em bagaço BD (10% m/m), pelo coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato. A sacarificação ocorreu durante 96 horas em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. O experimento foi realizado em duplicata.

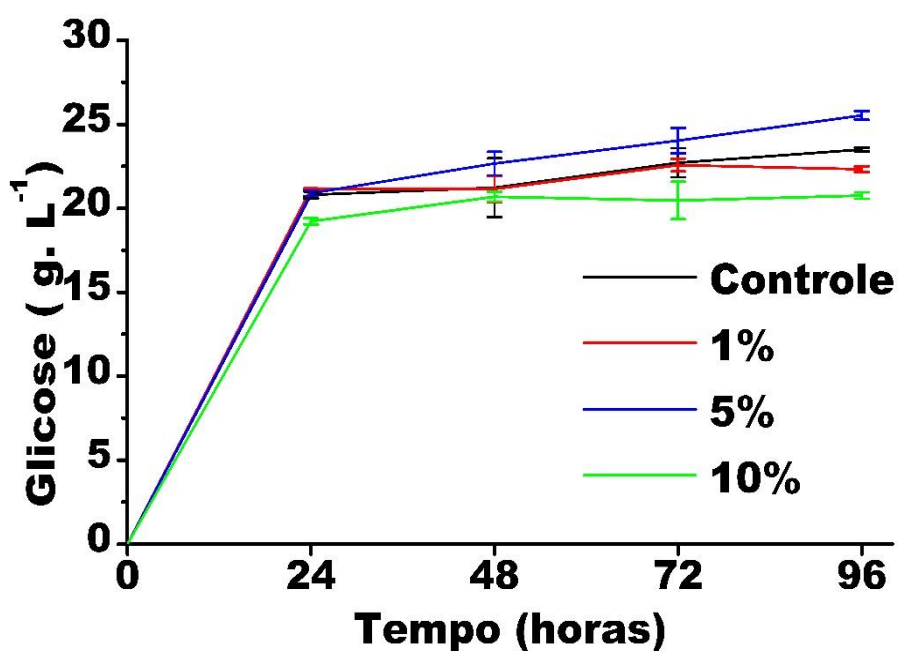


Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4.6. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de “bagaço *slurry*” com coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756, suplementado com a endoglucanase pertencente a família GH12

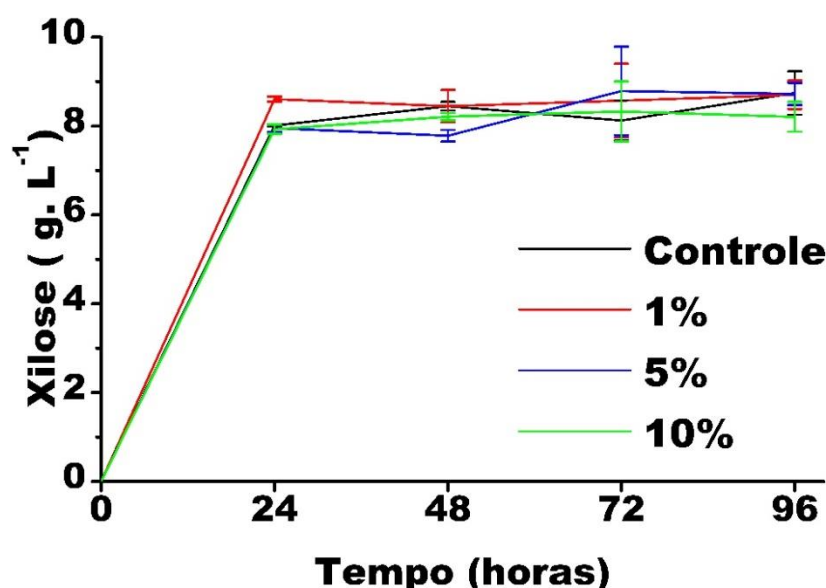
No bagaço *slurry*, nenhuma das concentrações utilizadas de GH12 aumentou significativamente a produção de glicose (Figura 34). O mesmo ocorreu na liberação de xilose, no qual em nenhuma das concentrações de GH12 avaliadas, tempos utilizados e tipo de bagaço ocasionou aumentos significativos ($P < 0,05$) (Figura 35).

Figura 34 Liberação de glicose (g/L), em bagaço *Slurry* (10% m/m), pelo coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato. Sacarificação ocorreu durante 96 horas em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. O experimento foi realizado em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 . Liberação de xilose (g/L), em bagaço *Slurry* (10% m/m), pelo coquetel de *T. aurantiacus* suplementado com GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato. Sacarificação ocorreu durante 96 horas em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. O experimento foi realizado em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

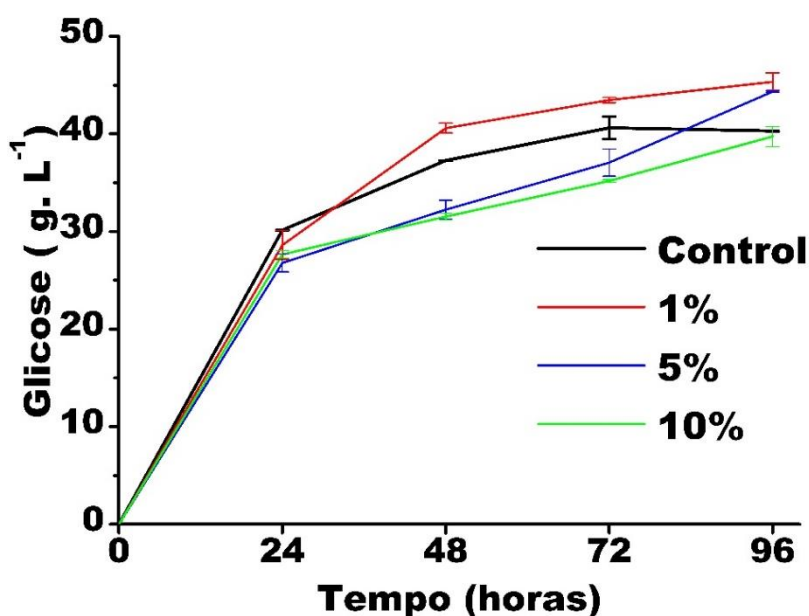
Narra et al. (2014) utilizaram GH12 purificada de *Aspergillus terreus* para suplementar celulases comerciais e obtiveram um aumento de 38,7% na eficiência de sacarificação da palha de arroz, em comparação com a celulase comercial sozinha demonstrando a existência de sinergia da GH12 com as demais celulases. Esses autores também demonstraram que o aumento da eficiência de hidrólise de materiais lignocelulósicos pode ocorrer com a suplementação desse tipo de celulase. Em adição, Banerjee et al. (2010) utilizaram endoglucanase da família GH12 de *T. reesei* para compor combinações específicas de enzimas, com a finalidade de integrar coquetéis otimizados para hidrolisar biomassa.

7.4.7. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados BD e *slurry* com coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com lacase CotA

Para o bagaço BD, o extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com 5% de lacase (CotA) no tempo de 96 horas apresentou o maior aumento significativo na liberação de glicose na sacarificação do bagaço BD ($P < 0,05$). Este ponto apresentou um aumento de 10% em relação ao controle. A liberação de glicose passou de $40,31 \pm 0,060$ g/L (controle) para $44,34 \pm 0,051$ g/L (Figura 36). Para este mesmo ponto (5% de lacase CotA em 96 horas), também foi detectado um aumento significativo na liberação de xilose na sacarificação do bagaço BD ($P < 0,05$). Assim, a liberação de xilose passou de $13,60 \pm 0,084$ g/L (controle) para $14,66 \pm 0,110$ g/L, o que representa um aumento na liberação de xilose de 9,3% (Figura 37).

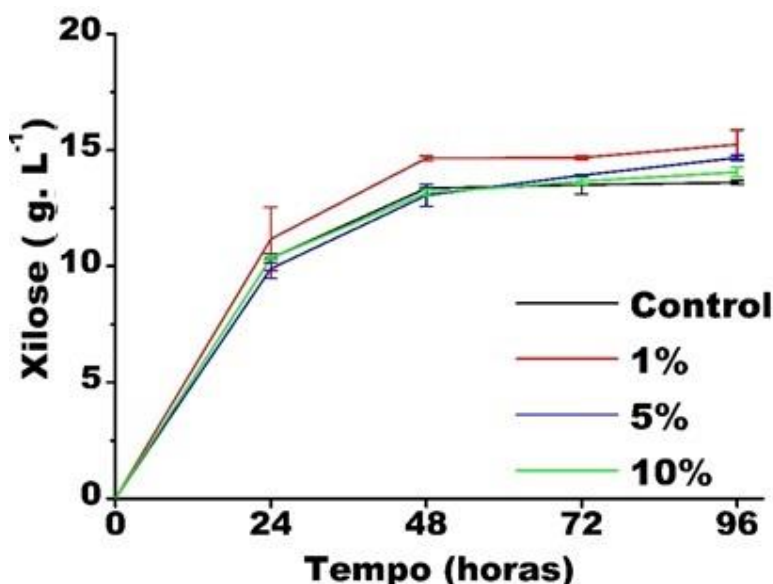
No entanto, o maior aumento significativo na liberação de xilose em bagaço BD foi encontrado na suplementação do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com 1% da lacase (CotA) no tempo de 96 horas ($P < 0,05$). Este aumento foi de 9,7%, a liberação de xilose passou de $13,35 \pm 0,019$ (controle) para $14,64 \pm 0,097$ g/L (Figura 37).

Figura 36 Liberação de glicose (g/L), em bagaço BD (10% m/m), pelo coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com lacase CotA em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato. Sacarificação ocorreu durante 96 horas. em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. O experimento foi realizado em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 Liberação de xilose (g/L), em bagaço SAQ (10% m/m) pelo coquetel de *T. aurantiacus* suplementado com lacase CotA em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato. Sacarificação ocorreu durante 96 horas, em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. O experimento foi realizado em duplicata.



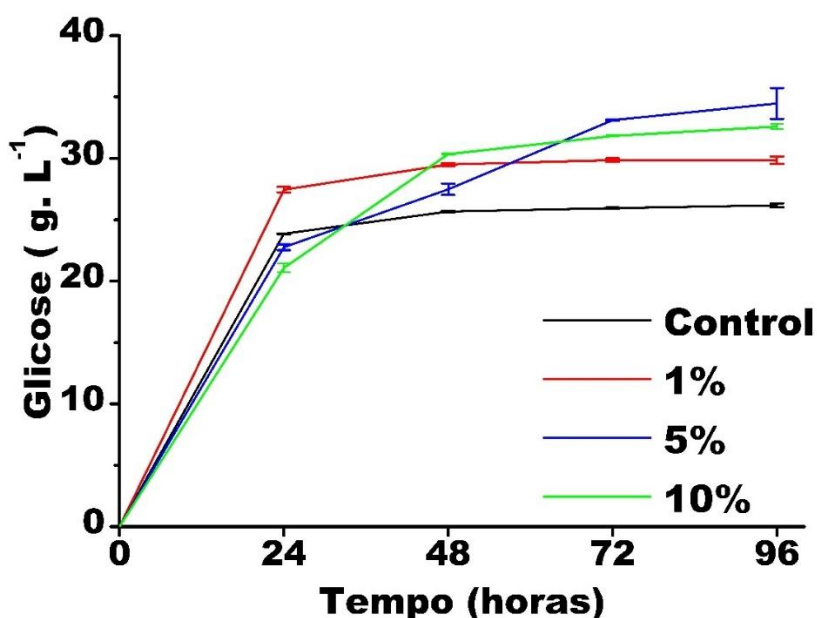
Fonte: Elaborado pelo autor.

7.4.8. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de “bagaço slurry” com coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com lacase

O maior aumento significativo na liberação de glicose na sacarificação para o bagaço *Slurry* foi a suplementação do o extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com 5% da lacase *CotA* no tempo de 72 horas, representando um aumento de 27% em relação ao controle ($P < 0,05$). Neste ponto, a liberação de glicose passou de $25,95 \pm 0,041$ g/L (controle) para $33,11 \pm 0,049$ g/L (Figura 38).

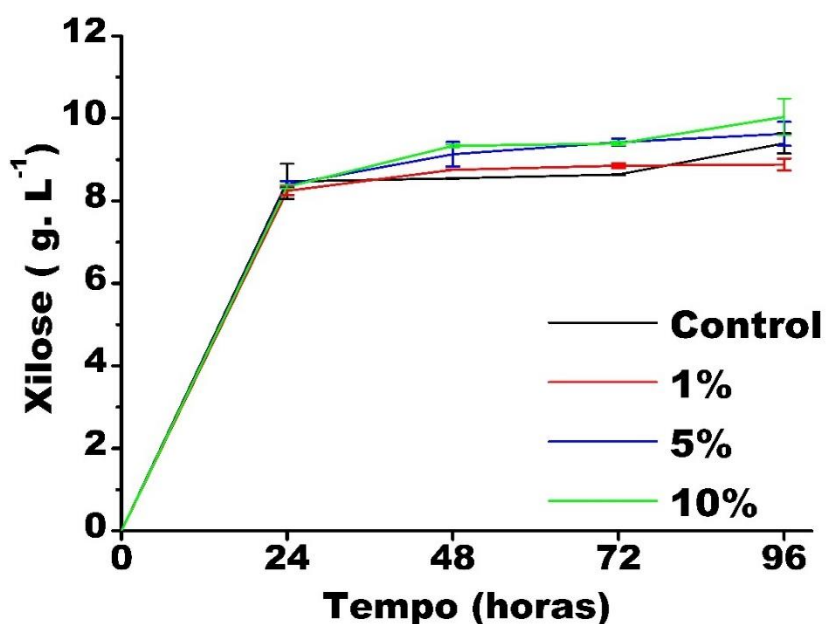
Para este mesmo ponto, também foi detectado o maior aumento na liberação de xilose na sacarificação do bagaço *Slurry* ($P < 0,05$). Assim, a liberação de xilose encontrada no tempo de 72 horas com 5% de lacase representa um aumento na liberação de xilose de 9,3% em relação ao controle, passando de $8,64 \pm 0,011$ g/L (controle) para $9,42 \pm 0,090$ g/L (Figura 39).

Figura 38. Liberação de glicose (g/L), em bagaço *Slurry* (10% m/m) pelo coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com lacase CotA em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato. Sacarificação ocorreu durante 96 horas, em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. O experimento foi realizado em duplicata.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 39. Liberação de xilose (g/L), em bagaço *Slurry* (10% m/m) pelo coquetel de *T. aurantiacus* suplementado com lacase CotA em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato. Sacarificação ocorreu durante 96 horas, em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. O experimento foi realizado em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A enzima lacase oxida fenóis e melhora a eficiência das enzimas lignocelulolíticas aumentando o rendimento da sacarificação (LEE et al., 2012). Moreno et al. (2016), ao utilizar uma lacase bacteriana, aumentou a liberação em 5% de glicose e xilose na sacarificação de palha de trigo proporcionando uma redução de compostos inibitórios, conduzindo a um melhorar o desempenho fermentativo.

Neste contexto, as moléculas fenólicas liberadas pela ação de lacases são relatadas por serem capazes de doar elétrons para as enzimas LPMOs. Assim, essa sinergia de lacases com AA9 podem contribuir para o aumento global de glicose durante a hidrólise da celulose (BRENELLI et al., 2018). Desse modo, visto que as enzimas AA9 foram identificadas no secreoma, o aumento evidenciado da produção de glicose ocorrido no coquetel de *T. aurantiacus* suplementado com a enzima lacase pode ter sido influenciado por esta sinergia.

7.5. CONCLUSÕES

A endoglucanase termoestável pertencente a família GH12 de *Streptomyces* sp. 11AG8 foi eficaz em aumentar a liberação de glicose significativamente apenas no bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento alcalino (BD). Enquanto a enzima lacase CotA se destacou ao suplementar o coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 por ser eficaz nos dois tipos de bagaços avaliados, atuando no aumento da produção tanto de glicose como xilose.

Os resultados obtidos são de grande importância, pois foram os primeiros a melhorar o rendimento de sacarificação do eficiente coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com a suplementação (adição *ex situ*) de enzimas recombinantes individuais, ausente no secretoma deste fungo. Dessa forma, nossos estudos de suplementação com enzimas recombinantes podem nortear para que *T. aurantiacus* se torne uma plataforma de produção e um coquetel de alto desempenho na obtenção de açúcares fermentecíveis.

CAPÍTULO 5

**Estudo e aplicação de endo-xilanases (GH11) recombinantes na
otimização do coquetel termofílico de *Thermoascus aurantiacus*
CBMAI 756**

8.1. RESUMO

Para a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa vegetal é importante buscar estratégias que evidenciam o desenvolvimento de misturas enzimáticas eficientes e de menor custo para sacarificar o material lignocelulósicos. Neste contexto melhorar a eficiência hidrolítica das hemicelulases em coquetéis fungicos para sacarificação da biomassa vegetal, principalmente a proveniente do bagaço da cana-de-açúcar com de importância para a biorrefinarias e para o etanol de segunda geração. Após a análise genômica do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 observou-se a ausência da sequência de genes que codificam enzimas hemicelulases da família GH11, que possui sinergismo com hemicelulases fúngicas da família GH10. O fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756 é uma linhagem altamente produtora de hemicelulases, tendo apenas a expressão de uma endo-xilanase da família GH10. O objetivo deste trabalho foi selecionar uma endo-xilanase eficiente da família GH11 para suplementar coquetel enzimático termofílico de *T. aurantiacus* CBMAI 756. Neste sentido, 6 endo-xilanases termofílicas recombinantes com potencial aplicação biotecnológica foram avaliadas quanto a sua eficácia em atuar nas condições ótimas conduzidas pelo coquetel enzimático deste fungo. As endo-xilanases selecionadas para este trabalho foram: GH11ST, clonada por este estudo da cepa *Streptomyces* F1, três endo-xilanases termoestáveis (uma nativa encontrada em metagenoma denominada XAT, juntamente com duas mutantes XAT^{M7} e XAT^{M12}), além de duas endo-xilanases de *Bacillus subtilis* (XBS^{M6} e XBS^{M6K99E}) desenvolvidas por evolução dirigida. Essas enzimas recombinantes foram expressas em *Escherichia coli* BL21 e purificadas por cromatografia de afinidade com níquel (IMAC). As seis endo-xilanases foram testadas isoladamente na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar nas condições do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756. De todas as enzimas avaliadas, destaca-se a xilanase mutante termoestável XAT^{M12} desenvolvida *in silico* (com 12 mutações), mostrou-se a mais eficiente em atuar de forma sinérgica nas condições do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756. Análise via HPLC mostraram essa enzima aumentou a liberação de xilose em 16,5% ao suplementar o coquetel enzimático deste fungo, no tempo de 96 horas da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com pré-tratamento alcalino. Portanto o eficiente arsenal hemicelulolítico de *T. aurantiacus* foi melhorado com a adição de uma endo-xilanase termoestável, pertencente à família GH11. Assim, a enzima mutante XAT^{M12} foi identificada como um importante alvo para ser inserido na maquinaria enzimática do fungo *T. aurantiacus* para aumentar sua capacidade em sacarificar a hemicelulose.

Palavras Chave: *Thermoascus aurantiacus*, suplementação enzimática, endo-xilanases, GH11, xilose.

8.2 INTRODUÇÃO

Melhorar a eficácia hidrolítica das hemicelulases na biomassa vegetal é de grande importância para a biorrefinaria e etanol de segunda geração (SONG et al., 2012). O uso de coquetéis enzimáticos termofílicos tem servido de estratégia para aprimorar o processo de hidrólise, tornando-a mais rápida eficiente e menos onerosa (MCCLENDON et al., 2012).

O fungo *T. aurantiacus* é reportado na literatura por produzir altos níveis de xilanases e um completo arsenal termofílico para hidrolisar a hemicelulose (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2008; DA SILVA et al., 2005). Contudo, no genoma de *T. aurantiacus* depositado no JGI Fungi Portal (<http://genome.jgi.doe.gov/Theau1/Theau1.home.html>) foi observado que dentre as anotações para CAZymes, não há genes que codificam a endo-xilanase pertencentes a família GH11.

Neste cenário, não foram encontrados relatos na literatura até o momento, dados sobre a expressão da endoxilanase pertencentes a família GH11 em cepas de *T. aurantiacus*. Um prévio estudo, demonstrado no Capítulo 2, caracterizou o arsenal enzimático hemicelulolítico secretado deste fungo que é composto por: GH10 (endo-1,4-beta-xilanase), GH3 (beta-xilosidase), CE16 (acetil xilano esterase), GH67 (alfa-glucuronidase), GH79 (beta-glucuronidase), CE15 (glucuronoil esterase), CE1 (carboxil esterase), GH51 (alfa-L-arabinofuranosidase), GH27 (alfa-galactosidase), GH47 (alfa-manosidase) e GH35 (beta-galactosidase).

A endo-xilanase GH10 é considerada uma das mais expressas e importantes enzimas no extrato de *T. aurantiacus* (KALLIOINEN; PURANEN; SIIKA-AHO, 2014; MCCLENDON et al., 2012; MONTE; CARVALHO; MILAGRES, 2010). Nossos dados de proteômica, obtidos no capítulo 2, evidenciaram que a expressão de endo-xilanase GH10 representa 13% de todas as CAZymes expressas, sendo uma das enzimas mais abundantes no secretoma deste fungo.

Em vista das hemicelulases da família 10 e 11, serem relatadas por apresentarem potencial de interação sinérgica, como demonstrado por Hu et al., (2013) e Zhang et al., (2011b), a endo-xilanase GH11 é eleita como enzima potencial para suplementar o extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 e melhorar os rendimentos de sacarificação da hemicelulose.

Nesse contexto, a suplementação do coquetel de *T. aurantiacus* com hemicelulases da família GH11 visa aumentar o potencial hemicelulolítico desse fungo, melhorando a liberação de xilose durante a sacarificação.

Tendo em vista que proteínas da mesma classe apresentam estabilidades, atividades específicas, especificidades de substratos diferentes o objetivo deste trabalho foi selecionar uma eficiente GH11 dentre várias endo-xilanases com potencial de aplicação biotecnológica, para suplementar o coquetel enzimático termofílico de *T. aurantiacus* CBMAI 756. Diversas endo-xilanases termofílicas foram escolhidas para serem avaliadas quanto a sua eficácia de sacarificar bagaço de cana-de-açúcar nas condições do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756. Em adição, este estudo também apresentou o objetivo de avaliar a relevância de enzimas mutantes para sacarificar do bagaço de cana-de-açúcar. Para a suplementação e testes de sinergismo com o coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 foram selecionadas e avaliadas 6 endo-xilanase termoestáveis da família GH11. Assim, foram escolhidas as seguintes endo-xilanases para serem avaliadas: GH11ST contendo um módulo de ligação a carboidratos (CBM) clonada da cepa de *Streptomyces* F1, três endo-xilanases termoestáveis denominadas XAT (uma nativa encontrada em metagenoma, juntamente com duas mutantes XAT^{M7} e XAT^{M12}), além de duas endo-xilanases mutantes de *Bacillus subtilis* XBS^{M6} e XBS^{M6K99E}, desenvolvidas por *silico* e *in vitro* estão descritas a seguir.

8.2.1. Endo-xilanases ambientais termoestáveis (XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12})

Dumon et al. (2008) construíram uma biblioteca com mais de 200 endo-xilanases e selecionaram uma endo-xilanase GH11 ambiental termoestável denominada XAT (GenBank: EU591742). Esta enzima apresenta 87% de similaridade com a enzima GH11 *Holomastigotoides mirabile* (GenBank: AB469374).

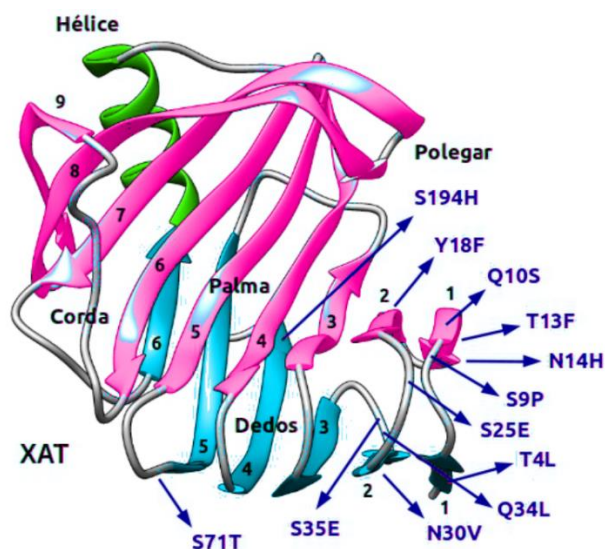
A enzima XAT selecionada pelo trabalho de Dumon et al. (2008) contém um domínio catalítico de 194 resíduos (21,2 kDa), T_m de 76,2 °C e temperatura ótima de 65 °C. Por meio da metodologia de mutagênese por saturação e triagem funcional (evolução dirigida), utilizando o gene selvagem XAT foram identificadas 15 mutações pontuais (Y18F, S71T, T4L, Q10S, T13F, S9P, N14H, S25E, N30V, Q34C, Q34H, Q34L, S35E, T13Y e S194H). Essas mutações que foram encontradas por serem responsáveis em aumentar a termoestabilidade, ampliando em 1-8 °C o valor de T_m.

Com a tecnologia de *Gene Reassembly* foram realizadas combinações por Dumon et al. (2008) que geram uma biblioteca com 12.288 mutantes únicos. Em triagens realizadas a 90 °C foi identificada uma enzima hipertermoestável derivada da nativa XAT, denominada de XAT^{M7} por conter 7 mutações (S9P, T13F, N14H, Y18F, Q34L, S35E e S71T). Este mutante XAT^{M7} obteve um T_m estimado em 101,1 °C e temperatura ótima de 75 °C e em

experimentos de termotolerância, reteve praticamente 100% de sua atividade inicial após 60 min de incubação a 73 °C (DUMON et al., 2008).

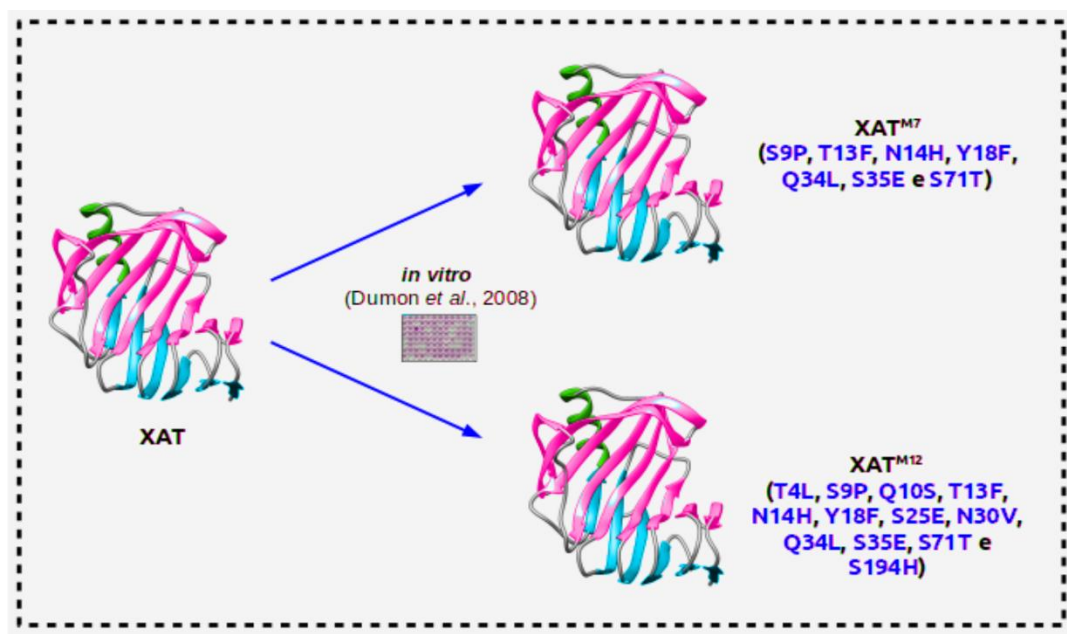
Pelas sequências disponibilizadas por Dumon et al. (2008), uma terceira e nova variante da nativa XAT, a mutante chamada de XAT^{M12} foi sintetizada pelo nosso grupo de pesquisa. Essa enzima é uma sequência consenso contendo todas as 7 mutações da XAT^{M7} (S9P, T13F, N14H, Y18F, Q34L, S35E e S71T) e mais 5 mutações (T4L, Q10S, S25E, N30V e S194H) de forma a cobrir todas as posições críticas para a termoestabilidade identificadas por Dumon et al. (2008) (Figura 40). A nova enzima mutante desenvolvida no laboratório foi denominada XAT^{M12} e sua caracterização bioquímica e biofísica foi avaliada neste estudo com as enzimas XAT e XAT^{M7} descritas por Dumon et al. (2008), a fim de obter a comparação e avaliação de seu potencial frente a suas variantes.

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}). A estrutura da XAT selvagem foi determinada por Dumon et al. (2008) (PDB: 2VUJ) e representa um exemplo clássico de GH11, possuindo todas as 15 cadeias β típicas dessa família.



.Fonte: Adaptada de Dumon et al. (2008).

Figura 41. Esquema representando as enzimas derivadas da GH11 ambiental (XAT) As mutações da enzima XAT^{M7} foram concebidas por evolução dirigida por Dumon et al. (2008) e a XAT^{M12} foi concebida pelo nosso grupo de pesquisa.



Fonte: Adaptada de Dumon et al. (2008).

8.2.2 Endo-xilanases mutante XBS^{M6} e XBS^{M6+K99E}

A GH11 de *Bacillus subtilis* recebeu seis mutações (T44A, Q7H, S22P, I51V, I107L e S179C) pelos trabalhos de evolução dirigida de Ruller et al. (2008) e Ruller et al. (2014) sendo denominada XBS^{M6}. Esta enzima foi obtida por evolução dirigida *in vitro*, envolvendo mutagênese aleatória e triagem funcional direcionada a termoestabilidade em relação a enzima nativa XBS.

Por meio de simulações computacionais (*in silico*) usando a metodologia de EIO (otimização de interações eletrostática) a enzima xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* com seis mutações XBS^{M6} recebeu a mutação K99E. Nesse contexto a enzima XBS^{M6K99E} (com a adição da mutação K99E) foi desenvolvida pelo departamento de Física da UNESP/São José do Rio Preto para aumento de termoestabilidade. Assim a enzima mutante XBS^{M6K99E} (mutação por evolução *in silico* e *in vitro*) foi caracterizada e avaliada pelos estudos de Ramos, (2017), que constatou o aumento na sua termoestabilidade em relação à enzima nativa XBS e em relação a mutante XBS^{M6}.

8.2.3 Endo-xilanases de *Streptomyces* sp F1

As enzimas encontradas nas espécies do gênero *Streptomyces* possuem características importantes, úteis em bioprocessos em nível industrial (JANG; CHEN, 2003; KIDDINAMOORTHY et al., 2008).

Além disso, a endo-xilanase pertencente à família GH11 da cepa *Streptomyces* sp F1, sequenciada por MELO, (2017) está depositada no GenBank: WP_070025267.1 e possui uma característica inovadora. Esta enzima possui um CBM com uma baixa identidade ao ser comparado com os CBMs depositados no GenBank, obtendo apenas 45% de similaridade com o CBM2 (1XBD_A).

Como os módulos não catalíticos, referidos como módulos de ligação a carboidratos (CBMs), são conhecidos geralmente por aumentar o desempenho catalítico de algumas enzimas como descrito por Paës; Berrin e Beaugrand, (2012) e Zhang et al. (2013), esta enzima torna-se um importante alvo a ser clonado e avaliado na aplicação biotecnológicas como a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

8.3 MATERIAIS E MÉTODOS

8.3.1 Produção do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756

O coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, foi produzido por fermentação submersa. Em meio PDA sólido o fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756 foi cultivado a 50 °C por 144 horas para a obtenção de uma suspensão de esporos de 10^5 por mL, os quais foram transferidos em uma solução nutriente de 100 mL contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,5 g/L); KH_2PO_4 (3,0 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L); CaCl_2 (0,5 g/L), Tween 80 (10,0 mL), pH ajustado para 5,0, com 2% (w/v) de fonte de carbono de uma mistura de palha de milho, farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, todos *in natura*. Esta fermentação foi incubada por 240 horas a 50°C em frascos de 250 mL agitados a 100 rpm. Após este período, o extrato enzimático foi filtrado e concentrado em um concentrador tangencial contendo uma membrana de 10 kDa de corte. A concentração total de proteínas foi dosada pelo método de Bradford utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) para a quantificação da proteínas totais (BRADFORD, 1976).

8.3.2 Endo-xilanases avaliadas

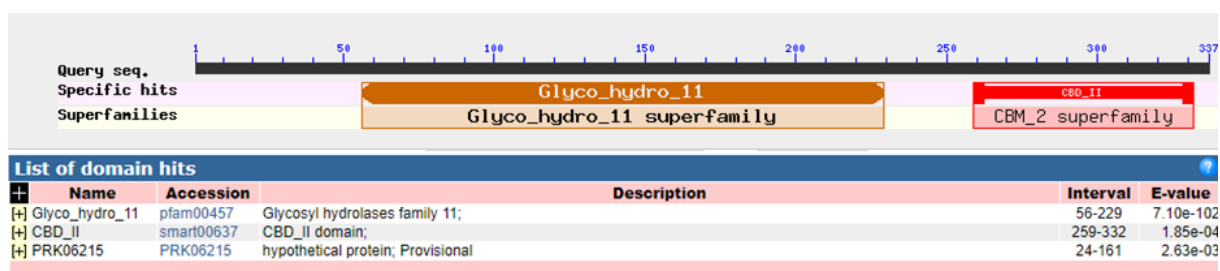
Seis endo-xilanases bacterianas pertencentes a família GH11 foram selecionadas para serem expressas em *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2 e serem avaliadas quanto ao potencial de

atuar e melhorar a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, ao suplementar o coquetel enzimático termofílico de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

Os genes das enzimas endo-xilanases XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12} ligados ao vetor de expressão pET28a(+) foram sintetizadas pela empresa GenScript. Os genes codificantes para as enzimas XBS^{M6} e XBS^{M6K99E} em vetor de expressão pET28a(+), utilizados pelos estudos de Ramos, (2017) foram cedidos em colaboração.

O gene predito para a endo-xilanase pertencente a família GH11 (WP_070025267.1) encontrado genoma da bactéria *Streptomyces* sp F1, apresentando dois domínios, sendo um a GH11 propriamente dita com 173 aminoácidos e o outro o CBM2 com 73 aminoácidos (conforme demonstrado na Figura 42) foi selecionado para ser clonado, sendo denominado nesse trabalho de GH11ST.

Figura 42. Domínios conservados da endo-xilanase pertencente a família GH11 da cepa *Streptomyces* sp F1. Esta proteína como um todo apresentou 337 aminoácidos e o tamanho de 36 kDa.



Fonte: Endo-xilanase depositada no GenBank: (WP_070025267.1) comparada com o banco de dados do NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/.

8.3.3 Clonagem da endo-xilanase GH11ST de *Streptomyces* sp. F1

8.3.3.1 Amplificação do gene de endo-xilanase por PCR

Para a amplificação do gene codificante da endoxilanase GH11ST de *Streptomyces* sp. F1, foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores *Forward* 5'GCTAGCGACACGGTCATCAC3' e *Reverse* 5'GGATCCTCAGCTCGCCG3'.

Para a extração do DNA genômico da cepa *Streptomyces* sp F1, esta foi cultivada no caldo ISP 2 em frascos agitados a 180 rpm, incubados a 30 ° C durante 72 horas. O *pellet* de células foi obtido por centrifugação a 10 000 x.g durante 10 min e foi utilizado para extração de DNA pelo kit Fast DNA SPIN para solo (MP Biomedicals, Irvine, CA).

Para a reação de PCR em 50 µL de reação foram utilizados 50 ng de DNA genômico de *Streptomyces* sp F1, 2 mM de MgCl₂, 10 pmoL de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 mM de dNTP, e 1 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EUA). A reação ocorreu com uma desnaturação inicial de 94 °C por 3 min seguida por 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C em 2 min e por fim uma extensão final a 72 °C por 4 min.

Uma parte do fragmento amplificados foi visualizado em fotodocumentador após eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado brometo de etídio. A banda de tamanho esperado para o gene da endo-xilanase foi submetida à purificação com o kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare).

8.3.3.2 Obtenção do vetor de expressão da endo-xilanase GH11ST

O fragmento de DNA correspondente ao gene da endo-xilanase GH11ST foi amplificado a partir do DNA genômico extraído da bactéria *Streptomyces* sp. F1 e purificado utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). Foi clonado no vetor pJET1.2/blunt com o kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific) conforme o fabricante, e o produto pJET-GH11ST foi transformado em *Escherichia coli* DH5α para amplificação dos plasmídeos. Conforme a metodologia descrita no item anterior, realizou-se PCR utilizando colônias transformadas e iniciadores para o sítio de clonagem do vetor pJET para que a clonagem fosse confirmada. Com a confirmação do clone positivo para o gene da endo-xilanase GH11ST este foi multiplicado para extração do DNA plasmidial também via transformação em *E. coli* DH5α.

Uma vez com o plasmídeo pJET-GH11ST confirmado, foi feita a digestão pelas enzimas de restrição NheI e BamHI (Thermo Scientific) utilizando o tampão Tango (Thermo Scientific), bem como o vetor pET-28a fechado. A eficiência da digestão foi verificada por gel de agarose 1%, e a banda do gel correspondente a GH11ST e ao pET28a aberto foi cortada e purificada. A ligação do vetor de expressão com o gene foi feita com o auxílio da T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) *overnight* a 4°C. Os plasmídeos pET28a(+)/(GH11ST) foram selecionados por PCR e em seguida confirmadas por sequenciamento de primeira geração pelo método de (SANGER e NICKLEN, (1977) utilizando o sistema Big Dye e o sequenciador automático ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

8.3.4 Expressão e purificação das endo-xilanases recombinantes XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12}, XBS^{M6}, XBS^{M6K99E} e GH11ST.

Para a expressão dos vetores pET28a(+)/(XAT), pET28a(+)/(XAT^{M7}), pET28a(+)/(XAT^{M12}), pET28a(+)/(XBS^{M6}), pET28a(+)/(XBS^{M6K99E}) e pET28a(+)/(GH11ST) a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2 foi utilizada. As colônias resultantes da transformação para cada endo-xilanase, foram cultivadas em um pré-inóculo (10 mL) de meio de cultura Luria-Bertani (LB) líquido com adição de canamicina (34 µg/mL) e cloranfenicol (40 µg/mL), sob agitação de 250 rpm, incubados a 37 °C *overnight*. O pré inóculo foi cultivado em 1 litro de LB nas mesmas condições, até atingir a densidade óptica de 0,6 (DO₆₀₀). A expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,5 mM de IPTG pelo período de 4 horas sob agitação de 250 rpm a 37 °C. Após esse período as células foram centrifugadas a 7000 x *g* por 30 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado congelado a - 20°C.

Para a lise celular as células sedimentadas foram ressuspensas em 20 mL de tampão imidazol, incubadas por 30 min em temperatura ambiente. O tampão de lise foi composto de imidazol 20 mM, NaCl 300 mM, fosfato monobásico 25 mM e fosfato dibásico 25 mM pH 7,4, 4 mM de PMSF, 1% Triton X-100, 100mg/mL de lisozima. Em seguida cada lisado celular foi sonificado e centrifugado a 10.000 x *g* durante 40 min a 4°C.

A purificação das enzimas ocorreu pela cromatografia de afinidade em coluna de níquel-sefaroze (GE Life Science, Upsala, Suécia), seguindo recomendações do fabricante. Após a eluição, as amostras purificadas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), corados com Coomassie Blue. As frações contendo as endo-xilanases com alto grau de pureza foram reunidas, e o tampão foi substituído pelo fosfato de sódio pH 7,0. A quantidade de proteína foi quantificada pelo método de Bradford.

8.3.5. Caracterização bioquímica

8.3.5.1. Determinação de pH e temperatura ótima

Das seis enzimas expressas neste estudo, as endo-xilanases- XBS^{M6} e XBS^{M6K99E} foram caracterizadas pelos estudos de Ramos, (2017).

Para as endo-xilanases XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12} e GH11ST a atividade de endo-xilanase foi determinada utilizando xilana (1%) obtida de madeira de faia (Sigma-Aldrich®). Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959). O pH ótimo foi determinado utilizando tampão cítrico/citrato de sódio 0,1 M

(pH de 4,0 a 6,5), fosfato monobásico/fosfato dibásico 0,1 M (pH de 7,0 a 8,0), tris/HCl 0,1 M (pH 8,5) e glicina/NaOH 0,1 M (pH 9 a 10) na temperatura de 50 °C. Para avaliação da temperatura ótima, foram avaliadas temperaturas da faixa de 25 a 95 °C, no melhor pH obtido de cada enzima.

8.3.5.2. Determinação de parâmetros cinéticos enzimáticos

Os parâmetros cinéticos enzimáticos foram determinados pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo hiperbólico de Michaelis-Menten: $v_0 = (V_{\max} \times [S]) / K_M + [S]$. K_M a constante de Michaelis-Menten, v_0 é a velocidade inicial de reação, $V_{\max}$ a velocidade máxima, $[S]$ a concentração de substrato. A constante catalítica de cada enzima (K_{cat}) e a constante de especificidade (K_{cat}/K_M) foi obtida. Os cálculos matemáticos foram realizados no software Graph Pad Prism 5.0 Software- 2018.

A atividade enzima foi determinada nas concentrações de 0,16 mg/mL a 25 mg/mL de xilana beechwood – Sigma-Aldrich). nas condições ótimas de pH, temperatura de cada enzima avaliada. Os açúcares redutores liberados em cada triplicata dos ensaios enzimáticos realizados, no tempo de reação de 10 minutos, foram quantificados pelo método do ácido DNS (Miller 1959).

8.3.6. Caracterização biofísica parcial das enzimas recombinantes purificadas

O estudo do perfil da estrutura secundária por dicróismo circular (CD) foi realizado com o objetivo de avaliar a estrutura secundária e determinar a temperatura de desnaturação térmica (T_m) de cada enzima recombinante caracterizada neste estudo

Para as análises de dicróismo circular (CD) no UV-distante um espectropolarímetro Jasco® 810 (Jasco International) foi utilizado acoplado a um sistema de controle de temperatura termo-elétrico (sistema Peltier) utilizando parâmetros descritos por (Kelly; Jess e Price, 2005). O experimento foi realizado em cubetas de 1 mm de quartzo de caminho ótico, com a concentração das enzimas variando de 0,2 a 0,3 mg/mL.

O perfil de estruturas secundária foi realizada na temperatura de 20 °C no intervalo de 195 a 260 nm em tampão e pH ótimos do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, citrato de sódio 0,20 mM, pH 4.8. Em um espectro de 220 nm foi realizado o monitoramento da elipticidade residual molar para calcular a temperatura de desnaturação térmica (T_m), durante um gradiente de 20 a 100 °C, com uma taxa de aquecimento de 1 °C min⁻¹. As análises de CD e desnaturação térmica foram realizadas em tampão citrato de sódio 20 mM, pH 4,8,

tampão este utilizado para a sacarificação do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

8.3.7. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados utilizados na sacarificação

Os dois tipos de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados, utilizados neste trabalho, foram adquiridos em colaboração com o Centro de Tecnologia do Bioetanol (CTBE) atual LNBR (Laboratório Nacional de Biorrenováveis) e sedidos pelo grupo de estudos de pré-tratamentos físico-químicos.

O bagaço denominado de BD foi obtido a partir de um pré-tratamento alcalino que consistiu em um aquecimento de 130 °C durante 30 min com 15% NaOH m/v. Esse pré-tratamento originou um bagaço com composição de 58,6% de celulose; 22,1% de hemicelulose; 8,8% de lignina, 10% de cinzas e com umidade de 8,27%. O bagaço denominado de *Slurry* foi obtido com pré-tratamento hidrotérmico sem a separação do licor gerado. Esse pré-tratamento consistiu em um aquecimento de 190 °C por 10 minutos gerando uma composição de 57,52% $\pm$ 0,40 % de glicose, 28,50% $\pm$ 0,24 de lignina e grupo acetil de 0,02%.

8.3.8. Suplementação de coquetéis enzimáticos fúngicos por enzimas recombinantes microbianas para a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar

8.3.8.1. Sacarificação enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática ocorreram com o teor de sólidos de 10% (m/m) e dosagem total de proteínas de 10 mg por grama de bagaço seco. Essa dosagem foi utilizada para o coquetel enzimático controle e também para as reações contendo a suplementação do coquetel com as enzimas recombinantes. Para as reações suplementadas com as enzimas recombinantes purificadas, a quantidade de proteína do coquetel fúngico (10 mg por grama de bagaço) foi substituída por 0,1, 0,5 e 1 mg/g de endo-xilanase recombinante, representando 1%, 5% e 10%, respectivamente do total de proteínas suplementada.

Os ensaios foram realizados em duplicata e foram tamponados respeitando o volume total da reação para o peso de 10 gramas (proximadamente 10 mL). As reações ocorreram em frascos de vidro tipo *schott* de 25mL, por 96 horas, incubados a 60 °C, em agitação de 200 rpm. As coletas ocorreram a cada 24 horas, cada ponto foi diluído 10 vezes. Após a adição de água as amostras foram centrifugadas a 4 °C, 14.000 x *g* por 10 minutos. Os sobrenadantes foram congelados até o momento para a quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta performance HPLC. O teste T de *Student* ao nível de probabilidade de 0,05 foi utilizado

para comparar os resultados de glicose e xilose obtidos em cada concentração. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Prism 6 (GraphPad Prism, La Jolla, CA, EUA).

8.3.9. Quantificação de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Os ensaios de quantificação por HPLC, foram realizados em colaboração com o setor de química analítica do CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol) atual LNBR (Laboratório Nacional de Biorrenováveis). A xilose e a glicose liberada em testes de hidrólise foram determinadas por Cromatografia de Troca Iônica de *Alta Performance* (High Performance Anion Exchange Chromatography) em um sistema de cromatografia Dionex ICS-3000, com a detecção amperométrica pulsada (PAD), equipado com coluna de separação CarboPac PA-1 (4 x 250mm). A uma vazão de 0,5 mL/min com o gradiente de 0-500 mM de acetato de sódio em 100 mM de NaOH os monossacarídeos foram eluídos.

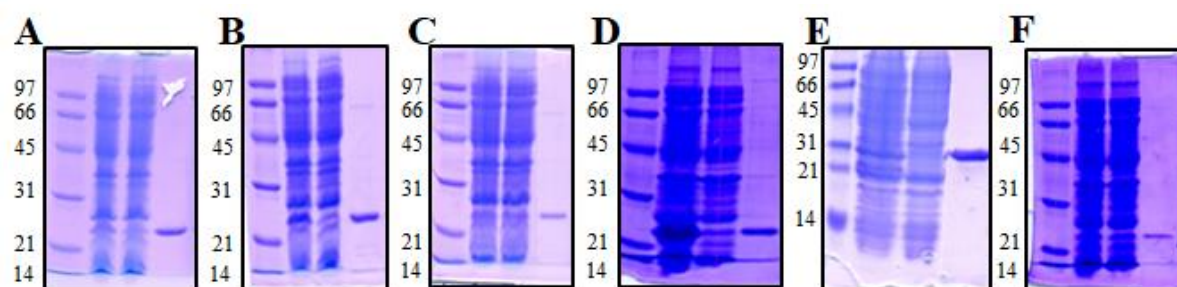
8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.4.1 Expressão e purificação das XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12}, GH11ST XBSM6 e XBS^{M6K99}

Para a expressão das endo-xilanase avaliadas para suplementar o extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, os vetores de expressão pET28a(+)/XAT, pET28a(+)/XAT^{M7}, pET28a(+)/XAT^{M12}, pET28a(+)/GH11ST, pET28a(+)/XBS^{M6} e pET28a(+)/XBS^{M6K99E} foram transformados em cepas de *E. coli* BL21(DE3).

Após expressão e purificação das endo-xilanases XAT (23,6 kDa), XAT^{M7} (23,7 kDa), XAT^{M12} (23,8 kDa), GH11ST com o domínio catálitico e CBM (36kDa), XBS^{M6} (23 kDa) e XBS^{M6K99E} (23 kDa) foram analisadas em gel de SDS-Page 12%, o que demonstrou um alto grau de pureza e eficiência para obtenção das enzimas (Figura 43).

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) GH11ST. e (F) XBS^{M6K99E}. As quatro canaletas de cada gel estão posicionadas na seguinte ordem: marcador de massa molecular em kDa, amostra injetada na coluna de purificação; fração não retida pela coluna ou *flow through* e fração da cromatografia correspondentes a cada endo-xilanase analisada).



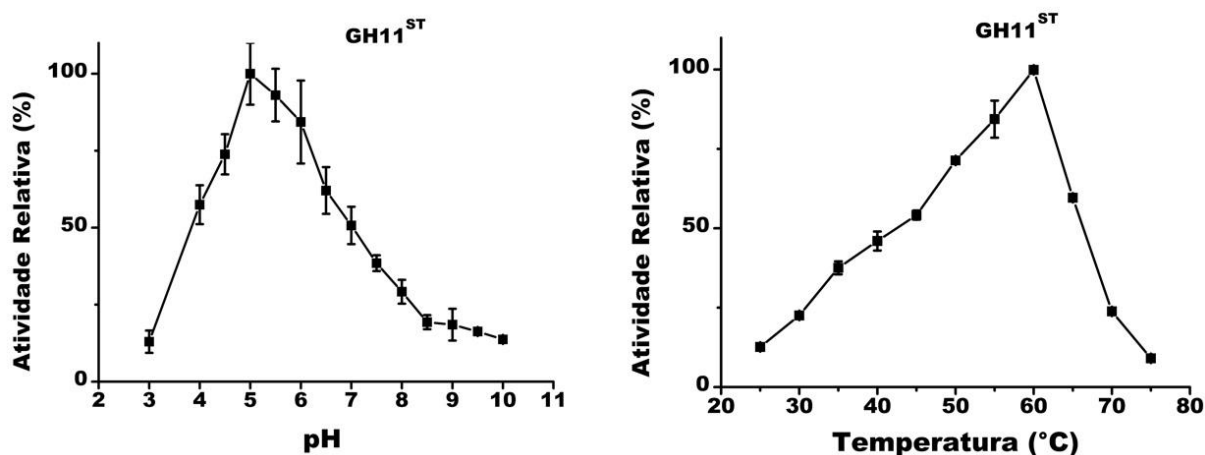
Fonte: Elaborado pelo autor.

8.4.2. Avaliação das condições ótimas de pH e temperatura das enzimas XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12} e GH11ST

As endo-xilanases XBS^{M6} e XBS^{M6K99E} apresentaram temperatura ótima de 60°C e um pH ótimo de 6 (Ramos, 2017). Os autores relatam que apesar da mutação K99E não ter proporcionado aumento de temperatura ótima, essa mutação foi responsável por induzir aumento da termoestabilidade em relação a enzima XBX nativa e XBX^{M6}.

Os efeitos do pH e da temperatura, foram avaliados na atividade das endo-xilanases GH11ST e XAT, XAT^M e XAT^{M12} em xilana de faia 1%. Para a enzima GH11ST a atividade ótima ocorreu no pH 5 e a temperatura de 60 °C representados na Figura 44. .Deesukon et al. (2013) ao caracterizar uma GH11 recombinante da cepa SWU10 de *Streptomyces* sp. encontrou o mesmo pH ótimo de 5, no entanto a temperatura ótima foi inferior, sendo esta de 40 °C.

Figura 44. Avaliação do efeito do pH e temperatura na atividade da enzima recombinante GH11ST. Ensaios de pH ótimo realizado a 50 °C (A) e o efeito da temperatura em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5 (B). Todas as reações foram realizadas em xilana de madeira faia a 1%. (xilana *beechwood* – Sigma-Aldrich).



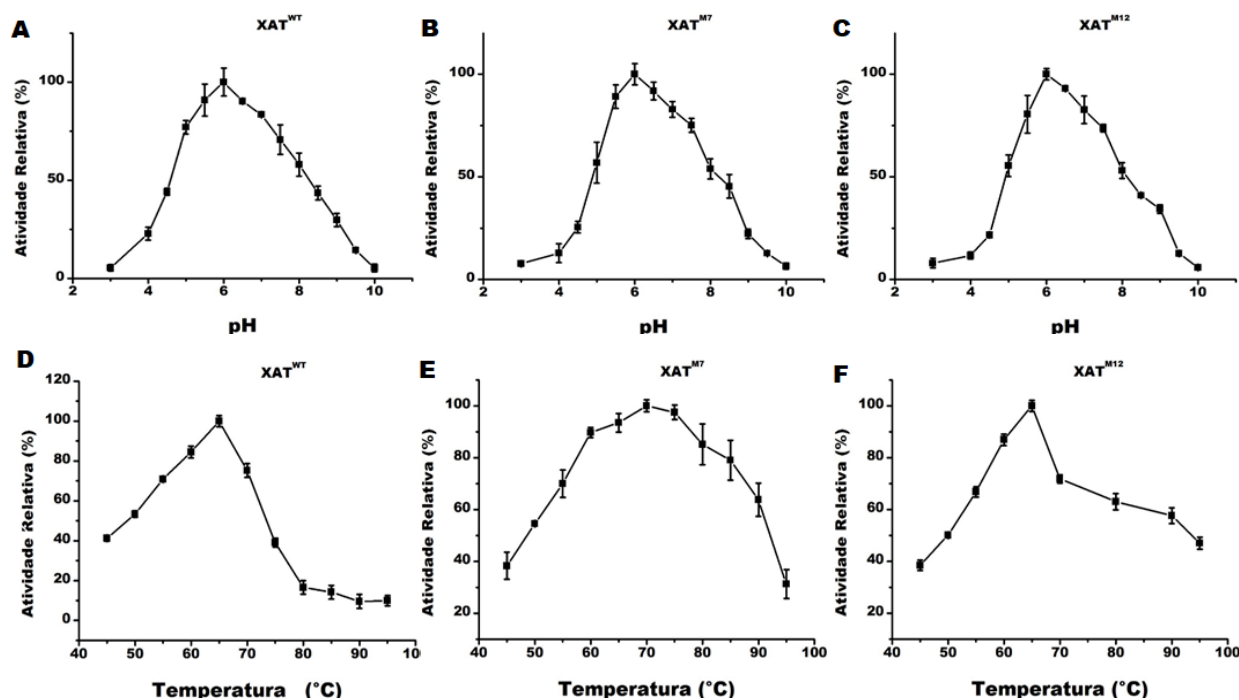
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos nos ensaios de temperatura e pH para as XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12}. O pH ótimo encontrado para a enzima nativa XAT, das mutantes XAT^{M7} e XAT^{M12} foi de pH 6 (Figura 45.). A nova enzima mutante XAT^{M12} foi caracterizada pela primeira vez e demonstrou não ter sofrido mudança de pH em comparação a enzima nativa XAT e a mutante XAT^{M7}.

A temperatura ótima no substrato xilana de faia para a enzima nativa XAT e a mutante XAT^{M12} foi de 65 °C, para o mutante XAT^{M7} foi de 70 °C (Figura 45.). Esses dados corroboraram com os valores obtidos por Dumon et al. (2008) no qual a mutante XAT^{M7} apresentou temperatura ótima maior que a nativa.

Não houve alteração de temperatura ótima da enzima mutante XAT^{M12} em comparação a da enzima nativa XAT. No entanto, pode-se observar nitidamente uma maior atividade relativa nas temperaturas mais elevadas (de 75 °C a 95 °C), como demonstrado nas Figura 45

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}. Todas as reações foram realizadas em xilana de madeira faia a 1 %. (xilana *beechwood* – Sigma-Aldrich).

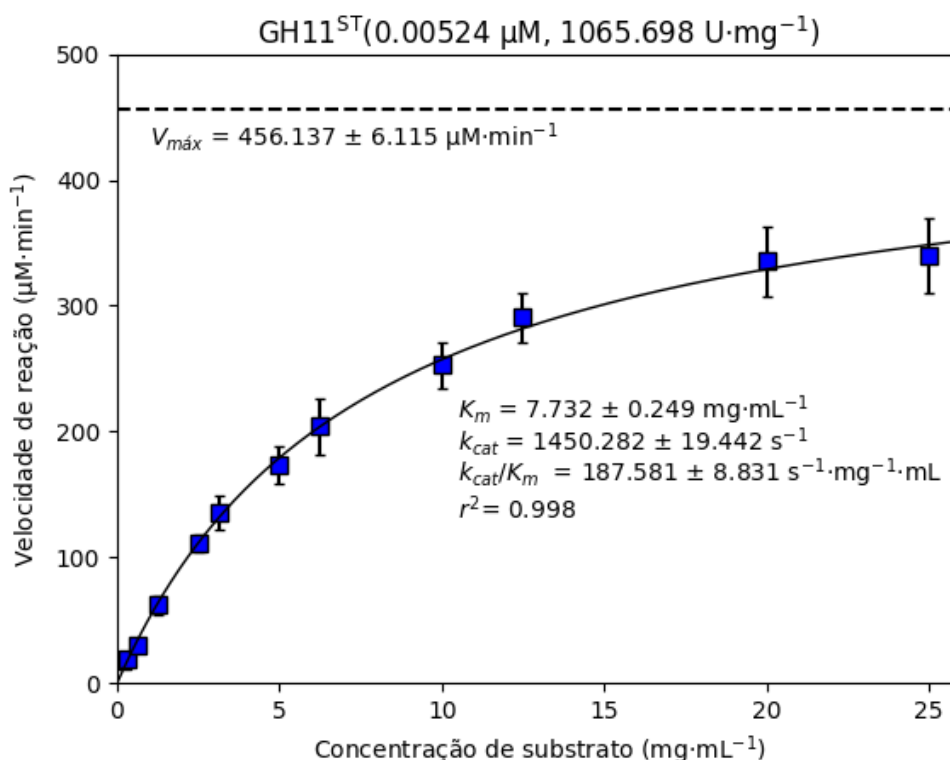


Fonte: Elaborado pelo autor.

8.4.3. Determinação de parâmetros cinéticos

Para a determinação de parâmetros cinéticos das enzimas GH11ST, XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12} foram utilizadas concentrações crescentes de xilano de faia (0,16 a 25 mg/mL) nas condições ótimas de atividade para cada enzima. O perfil cinético da enzima GH11ST foi apresentado dentro da Figura 46.

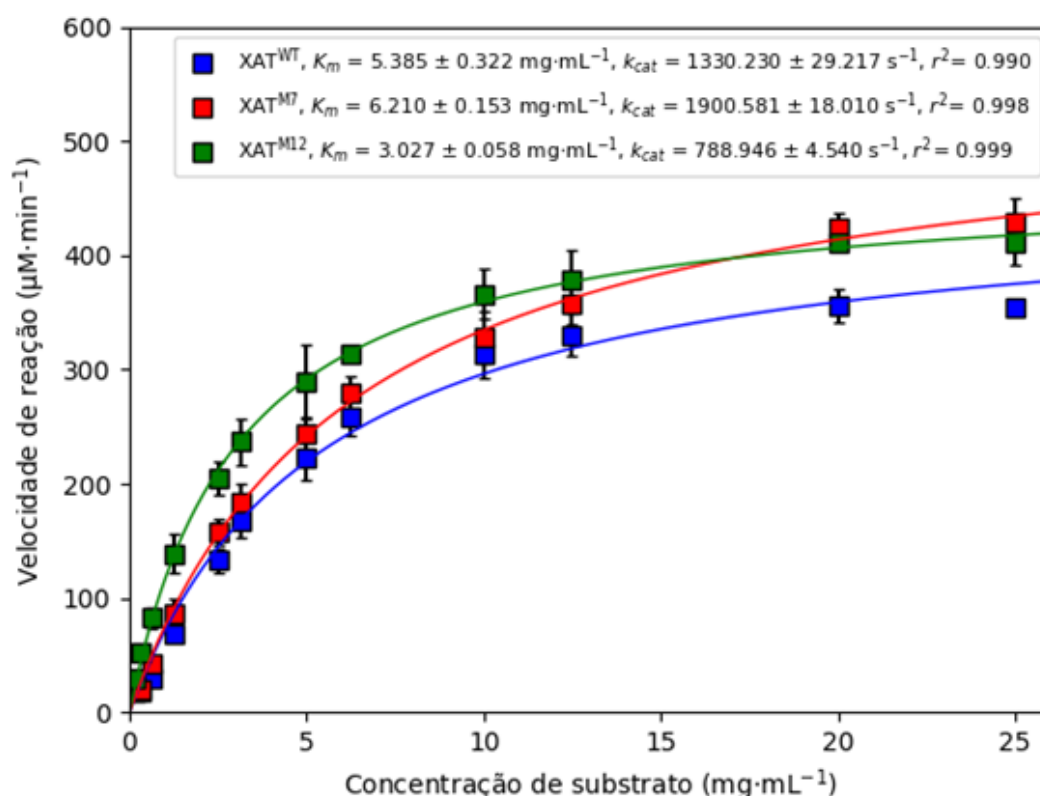
Figura 46. Curvas de cinética enzimática da enzima recombinante GH11ST. A curva foi obtida nas condições ótimas da enzima, os dados foram ajustados ao modelo hiperbólico de Michaelis-Menten para a obtenção dos parâmetros.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Hoffmam et al. (2016) desenvolveram uma quimera denominada BsXyl11-CBM6, unindo uma GH11 de *Bacillus subtilis* com o CBM6. Esta construção aumentou eficiência catalítica (K_{cat} / K_M) em 65% em relação a mesma enzima sem CBM. A enzima caracterizada por este trabalho GH11ST, também contendo um CBM, apresentou um K_{cat} / K_M de 187,5 s⁻¹ mg⁻¹mL sendo 2,8 vezes maior que o K_{cat} / K_M da quimera BsXyl11-CBM6 (66.4 s⁻¹ mg⁻¹ mL). Este resultado demonstra o potencial catalítico da endo-xilanase GH11ST, podendo até mesmo ser alvo para estudos relacionados a função do CBM. Os perfis cinéticos das enzimas XAT (nativa), XAT^{M7} e XAT^{M12} (mutantes) foram representados na Figura 47.

Figura 47. Curvas de cinética enzimática das enzimas recombinantes XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12}. As curvas foram obtidas nas condições ótimas de cada enzima, os dados foram ajustados ao modelo hiperbólico de Michaelis-Menten para a obtenção dos parâmetros. Na legenda são mostrados os valores de K_M , K_{cat} de cada enzima e os respectivos valores de r^2 para cada ajuste.



Fonte: Elaborado pelo autor.

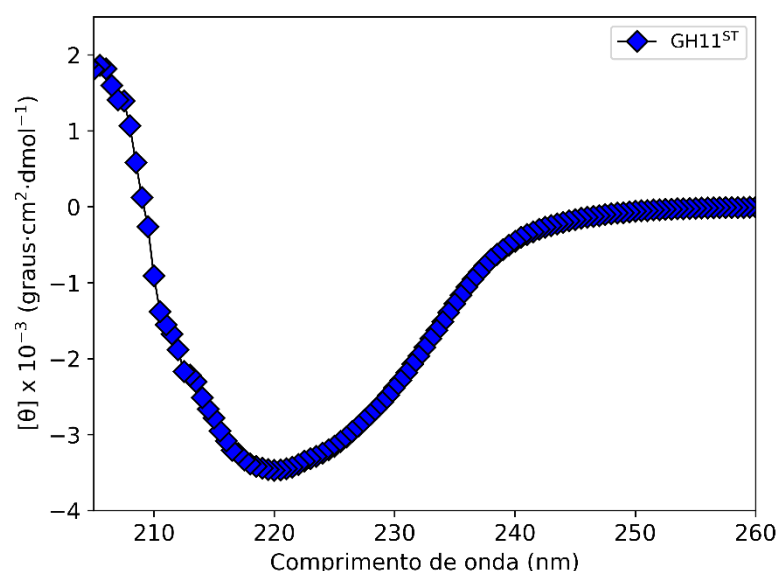
Ao realizar melhoramento por mutagênese sítio-específica de xilanases de *Bacillus pulminus* Duan; Chen e Wu, (2013) verificaram que com o aumento de termotolerância resultava na melhora no valor de K_{cat} , enquanto o valor de K_M diminuía. No entanto, nos resultados obtidos na Figura 47 apenas em relação a enzima nativa XAT o mutante XAT^{M7} (mais termoestável), foi observado um aumento do valor de K_{cat} . Apesar de XAT^{M12} ser mais termoestável que XAT o valor de K_{cat} da enzima XAT^{M12} em relação a nativa XAT foi menor. Contudo o aumento do valor de K_{cat} é relatado ser muito importante para a hidrólise enzimática, uma vez que nesse tipo de processo utiliza substratos altamente complexos e em concentrações saturadas (SONG et al., 2012).

8.4.4. Análise do perfil da estrutura secundária por dicroísmo circular (CD)

Para a caracterização biofísica parcial das enzimas XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12} e GH11ST foram realizados os perfis de dicroísmo circular e desnaturação térmica da estrutura secundária das enzimas recombinantes, nas condições ótimas de hidrólise do extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (tampão acetato pH 4.8). Através da técnica de dicroísmo circular (CD) foi determinado o perfil de estrutura secundária das enzimas com base nos espectros. O Perfil de (CD) da enzima recombinante GH11ST está representado na Figura 48, e para as enzimas XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12} estão representados na Figura 49.

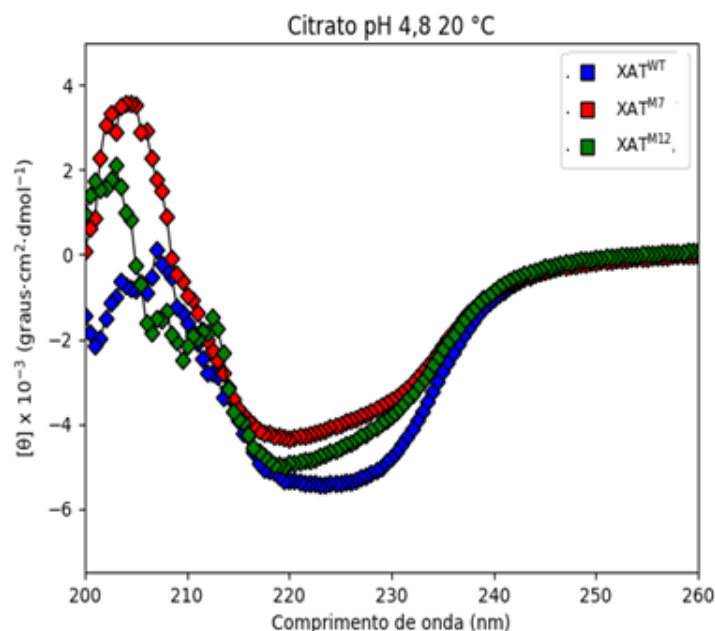
O alto teor de folhas β foi encontrado para as enzimas GH11ST, XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12} mostrando ser perfil característico de proteínas pertencentes a família GH11. Os perfis de CD mostraram um mínimo em 220 nm mais acentuado para todas as enzimas estudadas, como característica de proteínas com predominância de folhas β . Os experimentos de CD foram realizados com as enzimas GH11ST, XAT e seus mutantes, em tampão citrato pH 4,8 a 20 °C.

Figura 48. Perfis de dicroísmo circular (CD). Espectros de CD da enzima GH11ST. Ensaios realizados a 20 °C em citrato de sódio 20 mM pH 4,8. As amostras de proteína foram padronizadas em 0,3 mg/mL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 49. Perfis de dicroísmo circular (CD). Espectros de CD das enzimas recombinantes XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12}. Ensaios realizados a 20 °C em citrato de sódio 20 mM pH 4,8. As amostras de proteína foram padronizadas de 0,2 mg/mL a 0,3 mg/mL.



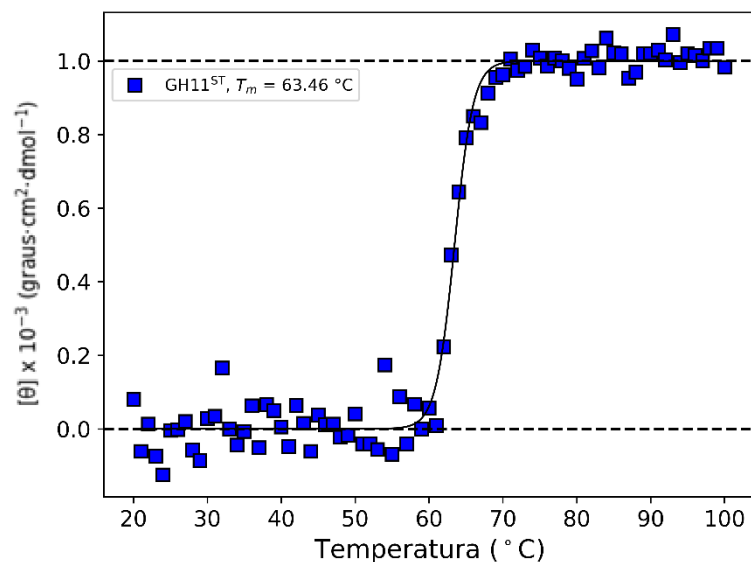
Fonte: Elaborado pelo autor.

8.4.5. Desnaturação térmica das enzimas XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12} e GHST

A técnica de CD também foi utilizada para monitorar as mudanças na estrutura secundária das enzimas estudadas durante o aquecimento da amostra e estimar a temperatura de transição na fração desenovelada (T_m). O monitoramento da desnaturação térmica foi realizado pela mensuração da elipticidade molar em um comprimento de onda fixo, correspondente ao valor mínimo de elipticidade molar observado a 20 °C para cada enzima, através de medições realizadas ao longo de um gradiente de temperatura de 20 °C a 100 °C.

Os resultados da desnaturação térmica em tampão citrato 0,02 M, pH 4,8 estão representados na Figura 50 para a enzima GH11ST e na Figura 51 para as enzimas recombinantes XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12}. O T_m obtido para a enzima GH11ST no valor de 63,46 °C (Figura 50) foi compatível com a temperatura ótima de atividade a 60°C e com a queda repentina obtida nas temperaturas maiores ao valor do ótimo.

Figura 50. Curva de desnaturação térmica da enzima recombinantes GH11ST em citrato de sódio 20 mM pH 4,8. Amostras aquecidas 1°C/ min de 20 a 100°C. As amostras de proteína foram padronizadas para 0,3 mg/mL.



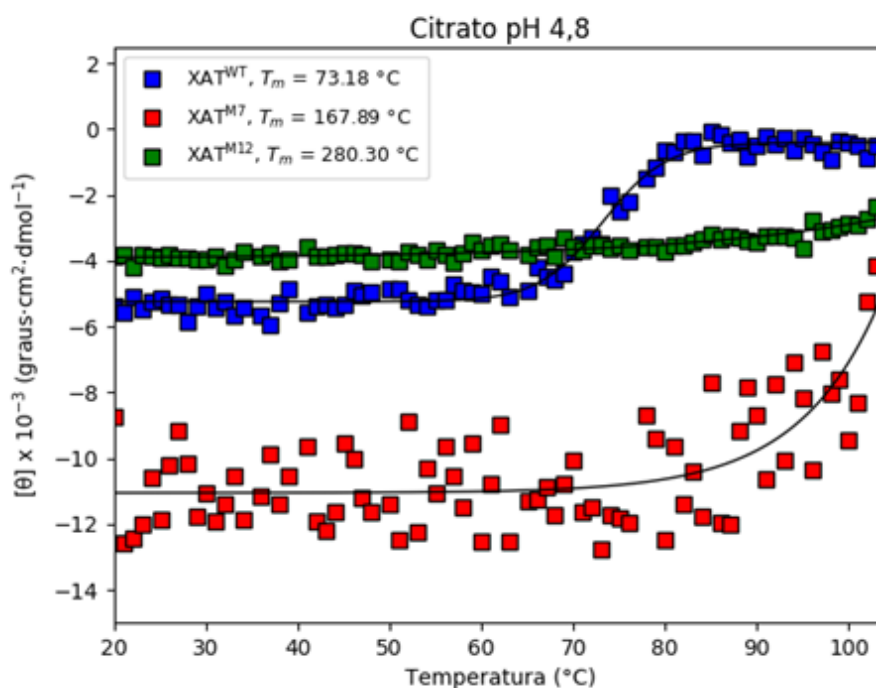
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nossos resultados encontraram o valor de T_m de 73,18 °C para XAT, valor próximo a 76,2 °C encontrado por Dumon et al. (2008) para a mesma enzima (Figura 51). No entanto, apesar desse experimento ser realizado com a temperatura máxima do equipamento (100 °C), não foi possível observar transição da fração desenovelada, durante o aquecimento das amostras XAT^{M7} e XAT^{M12} como a da enzima XAT. Portanto, devido à alta termoestabilidade das enzimas XAT^{M7} e XAT^{M12} não foi possível determinar a temperatura de T_m . Com os dados obtidos, apenas uma estimativa teórica foi realizada para o cálculo da temperatura de transição (T_m). Assim, o T_m estimado para as enzimas mutantes XAT^{M7} e XAT^{M12} foram de 167,89 °C e 280,30 °C, respectivamente.

Nesse sentido, pode-se constatar que as mutações na enzima XAT^{M7} e do novo mutante XAT^{M12}, foram capazes de induzir aumento da termoestabilidade quando comparada a forma nativa como mostrado na Figura 51. O aumento de termoestabilidade de XAT para XAT^{M7} já havia sido reportado por Dumon et al. 2008, e foi confirmado por nossos resultados no tampão citrato pH 4,8.

A mutante XAT^{M12} com as mutações selecionadas pelo nosso grupo de pesquisa, não havia sido avaliada. Esta enzima apresentou maior termoestabilidade em relação a enzima mutante XAT e uma tendência de ser mais termoestável que a mutante XAT^{M7} (Figura 51), o que contribui para justificar nossas análises comparativas.

Figura 51. Curva de desnaturação térmica das enzimas recombinantes XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12} em citrato de sódio 20 mM pH 4,8. Amostras aquecidas 1°C/ min de 20 a 100°C. As amostras de proteína foram padronizadas para 0,2 mg/mL e 0,3 mg/mL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, pode-se verificar que a caracterização bioquímica e biofísica da XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12}, confirmaram a termoestabilidade das enzimas mutantes em relação à selvagem. Essas propriedades bioquímicas em conjunto com a eficiência catalítica encontradas em altas temperaturas tornam essas enzimas biocatalisadores potenciais e diferenciados para aplicações em processos industriais em temperaturas elevadas.

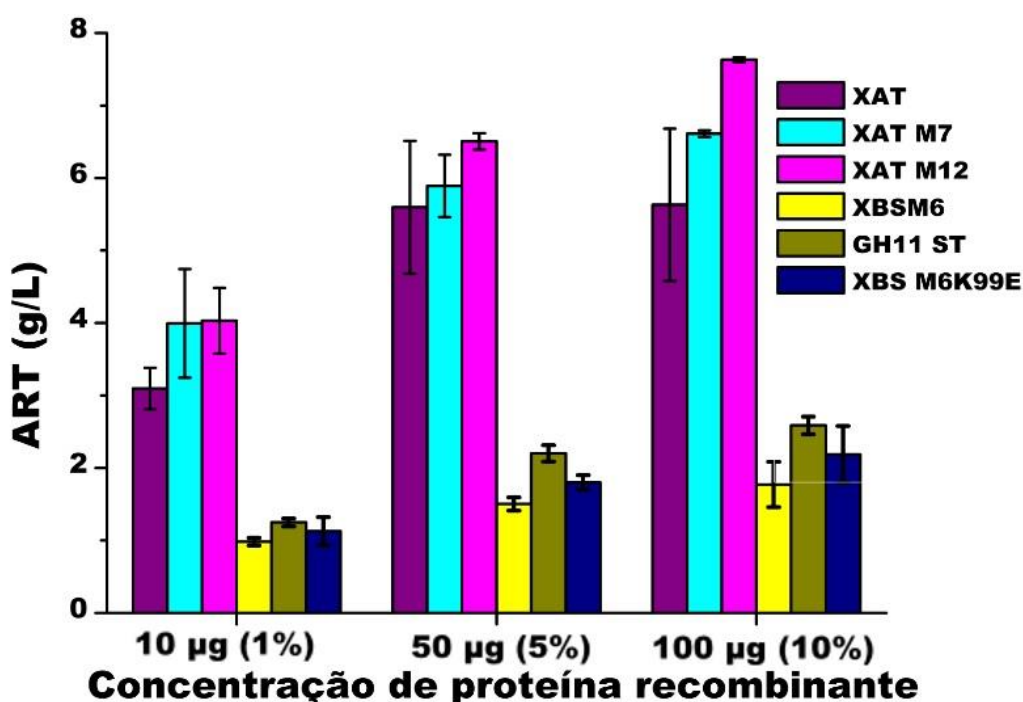
Desse modo, tanto XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12} e GH11ST apresentaram grande potencial de aplicação na hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar, possivelmente com grande eficiência de conversão a temperatura de 60 °C, temperatura esta ótima para hidrólise do extrato de *T. aurantiacus* CBMAI 756.

8.4.6. Avaliação e comparação da eficiência das endo-xilanases XAT, XAT^{M7}, XAT^{M12}, GH11ST, XBS^{M6} e XBS^{M6+K99E} na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

As endo-xilanases selecionadas neste estudo, foram testadas para sacarificar o bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratado hidrotérmico alcalino (BD). Portanto as seis GH11 foram analisadas individualmente (sem o coquetel enzimático), nas condições ótimas que o coquetel base de *T. aurantiacus* CBMAI 756 (tampão citrato pH4,8 e 60°C), em três concentrações, sendo as mesmas proporções da suplementação.

As enzimas XAT XAT^{M7} e XAT^{M12} se destacaram por liberar as maiores quantidades de açúcares redutores nas três concentrações de proteínas avaliadas nos ensaios de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar BD (Figura 52). Os maiores valores de Tm foram obtidos pelas enzimas XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12} (Tabela 7) o que pode ter favorecido o melhor desempenho de liberação de açúcares redutores para estas enzimas, nas condições que foram aplicadas.

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}, GH11ST, XBS^{M6} e XBS^{M6+K99E}. Experimento em microtubos de 2 mL, contendo 10% de biomassa a 60 °C, em tampão citrato pH 4.8 por 24 horas. Cada enzima foi avaliada nas concentrações de 10 µg, 50 µg e 100 µg por reação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Entre as proteínas XAT XAT^{M7} e XAT^{M12} nas concentrações de 10 µg e 50 µg não foram observadas diferenças significativas na liberação de açúcares redutores. Nas reações com a concentração de 100 µg de proteína, a diferença de liberação de açúcares redutores de 7,63 mg/mL $\pm$ 0,032 para enzima XAT^{M12} e 6,61 $\pm$ 0,047 da enzima XAT^{M7} foi significativa. Portanto na concentração de 100 µg a enzima mutante XAT^{M12} liberou a maior concentração de açúcares redutores em 24 horas de sacarificação, sendo 15,4 % maior que a liberação da enzima mutante XAT^{M7} (Figura 52). Esses resultados demonstraram a relevância biotecnológica da enzima XAT^{M12}, no qual, apresenta mutações que aumentaram a termoestabilidade.

A endo-xilanase GH11ST apresentou alto valor de K_{cat} quando comparado as outras endo-xilanases deste estudo (Tabela 7) Endo-xilanases GH11 com alta constante catalítica apresentam melhores performance na liberação de açúcares redutores (SONG et al., 2012). No entanto, a termoestabilidade de GH11ST foi menor em comparação as enzimas XAT, XAT^{M7} e XAT^{M12}, o que pode ter influenciado para o seu menor desempenho na liberação de açúcares redutores, nas condições propostas. Contudo, o destaque para os bons parâmetros cinéticos obtidos pela GH11ST (Tabela 7), faz dessa enzima uma ótima opção para sacarificação em temperaturas mais baixas, além de uma excelente candidata para estudos de melhoramento de sua termoestabilidade.

Tabela 7. Comparação dos parâmetros cinéticos, temperatura desnaturação térmica (T_m), e ótimo de atuação de cada endo-xilanase avaliadas.

	V _{máx} μM.min ⁻¹	K _m mg.mL ⁻¹	K _{cat} s ⁻¹	K _{cat} /K _m mL.mg. ⁻¹ .s ⁻¹	T _m °C	pH/ Temperatura	Autor
XAT	455,73 ± 10,01	5,38 ± 0,322	1330,2 ± 29,21	247,00 ± 21,49	73,18	pH6 65 °C	Este Trabalho
XAT^{M7}	542,35 ± 5,13	6,21 ± 0,153	1900,5 ±18,01	306,04 ±10,67	Teórico 167,89	pH6 70°C	Este Trabalho
XAT^{M12}	468,084 ± 2,69	3,02 ± 0,058	788,94 ± 4,540	260,66 ± 6,63	Teórico 280,30	pH6 65°	Este Trabalho
GH11ST	456,13 ± 6,11	7,73 ± 0,24	1450,2 ±19,44	187,58 ±8,83	63,46	pH5 60 °C	Este Trabalho
XBS^{M6} K99E	670,4 ±11,43	8,55 ± 0,33	305,9 ± 5,2	35,75 ±2,10	64,73	pH6 60 °C	Ramos, (2017)
XBS^{M6}	530,44 7 ± 7,66	5,89 ± 0,22	239,83 ± 3,46	40,68 ± 2,22	63,94	pH 6 60 °C	Ramos, (2017)

Fonte: Elaborado pelo autor.

As enzimas XSB^{M6} e XSB^{M6K99E} apresentaram cerca de 30% de atividade em pH 4,5 conforme os dados de Ramos, (2017). Essa baixa atividade nessa faixa de pH, pode ter prejudicado o desempenho desta enzima na sacarificação realizada em pH 4.8.

Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre as duas enzimas mutantes XSB^{M6} e XSB^{M6K99E} na liberação de açúcares redutores (Figura 52). Esses resultados corroboram com os de Ramos, (2017) que também não constatou diferença na liberação de açúcares redutores entre XSB^{M6} e XSB^{M6K99E} sozinhas, durante a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar a 50 °C.

8.4.7. Suplementação do coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 com endo-xilanase recombinante termoestável XAT^{M12}

A enzima XAT^{M12} foi selecionada para a suplementação do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 para sacarificar bagaço de cana-de-açúcar uma vez que a enzima XAT^{M12} se destacou pelas maiores quantidades de liberação de açúcares redutores ao ser comparada com as outras endo-xilanases XAT, XAT^{M7}, XSB^{M6}, XBS^{M6K99} e GH11ST. A

maior liberação de açúcares redutores por esta enzima pode ter ocorrido por conta do menor valor de K_M da enzima mutante XAT^{M12}, visto que Voet e Voet, (2013) relatam que enzimas com o K_M baixo apresentam uma elevada afinidade pelo substrato, atingindo o máximo da eficiência catalítica.

A suplementação ocorreu com a enzima mutante XAT^{M12} em três concentrações de proteína (0,1, 0,5 e 1 mg/g) por 96 horas para a avaliação da liberação de glicose e xilose na sacarificação de dois tipos de bagaço pré-tratado, BD (deslignificado alcalino) e *Slurry* (hidrotérmico auto-catalítico sem separação).

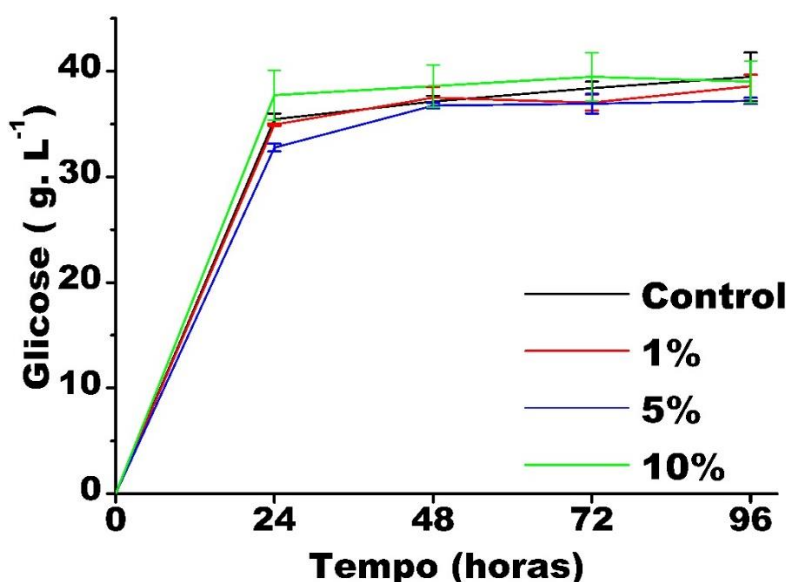
8.4.8. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de bagaço BD com o coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com a endo-xilanase XAT^{M12}

Na sacarificação do bagaço BD, nenhuma das três concentrações de XAT^{M12} utilizadas na suplementação do extrato enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756 proporcionou aumentos significativos da liberação de glicose nos tempos avaliados (Figura 53).

Em relação a liberação de xilose, o maior aumento significativo ocorreu no ensaio com a suplementação de 10% da endo-xilanase XAT^{M12} no tempo de 96 horas de sacarificação. Este ponto apresentou um aumento significativo de 16,5% na produção de xilose, em relação ao controle. Assim a liberação de xilose passou de $11,27 \pm 0,112$ g/L para $13,14 \pm 0,015$ g/L (Figura 54).

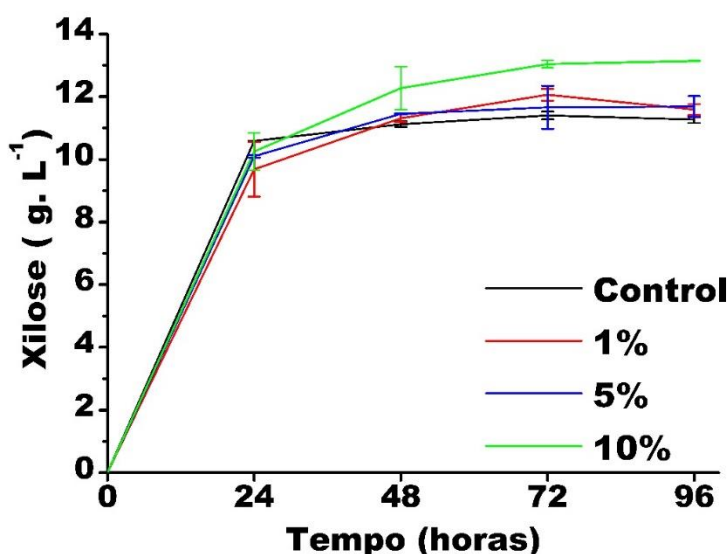
Hoffman et al, (2016) suplementaram o coquetel comercial Accellerase® 1500 com a endo-xilanase BsXyl11-CBM6 pertencente a família GH11 e observaram uma melhoria de 17% na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar explodido e deslignificado. No entanto seus resultados foram representados em açúcares redutores totais, para a suplementação de um coquetel que predomina endocelulases e β -glicosidase. Em nossos resultados um real aumento ocorreu na liberação de xilose na sacarificação de um coquetel hemicelulolítico.

Figura 53. Liberação de glicose (g/L), em bagaço BD (10% m/m) pelo coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com endoxilanase XAT^{M12} em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato. A sacarificação ocorreu durante 96 horas, em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm (10mg/g). Experimento realizado em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 54. Liberação de xilose (g/L), em bagaço BD (10% m/m) pelo coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com endoxilanase XAT^{M12} em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato (10mg/g). A sacarificação ocorreu durante 96 horas, em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. Experimento realizado em duplicata.

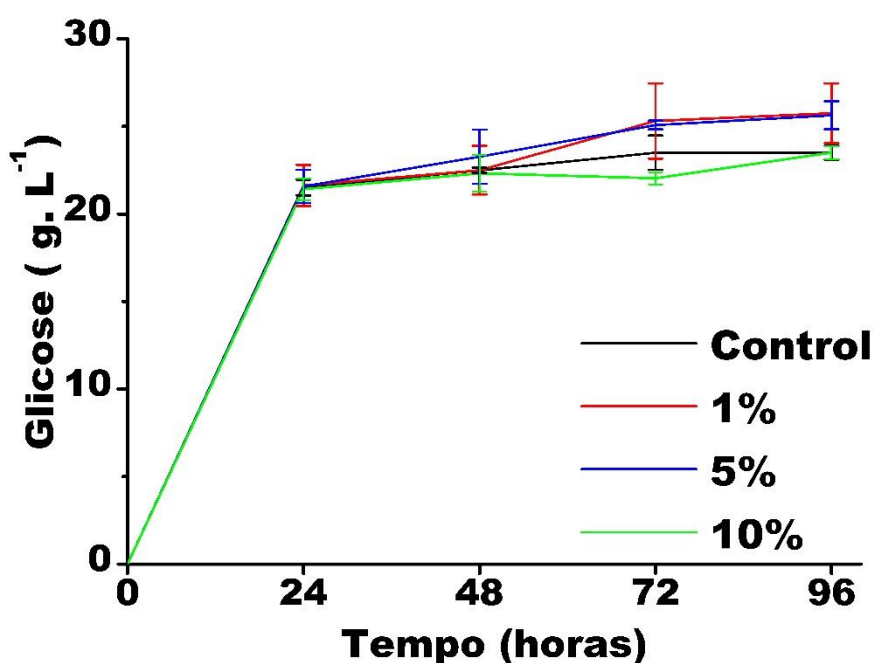


Fonte: Elaborado pelo autor.

8.4.9. Liberação de glicose e xilose na sacarificação de bagaço slurry com o coquetel de *T. aurantiacus* CBMAI 756 suplementado com a endo-xilanase XAT^{M12}

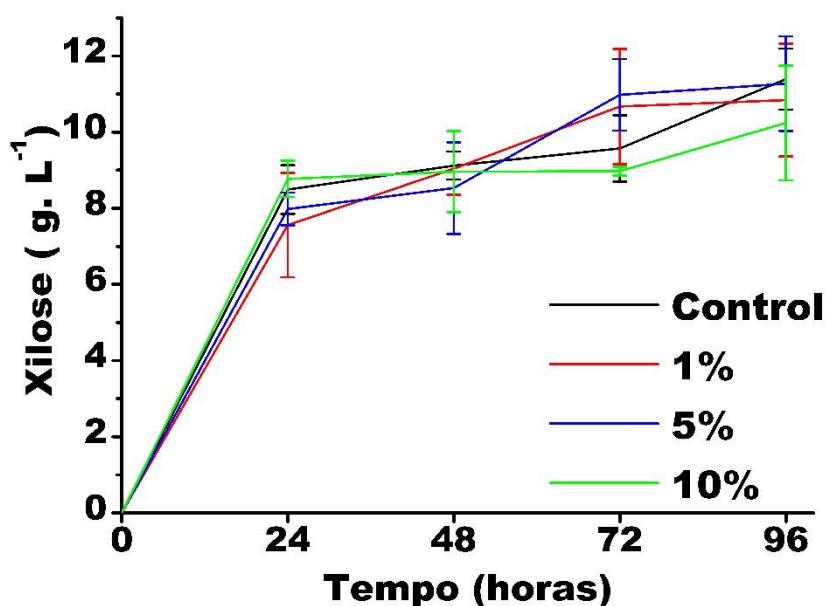
Na sacarificação do bagaço Slurry, nenhuma das concentrações utilizadas na suplementação da endoxilanase XAT^{M12} apresentou um aumento significativo de produção de glicose e xilose (Figuras 55 e 56).

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} em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato (10mg/g). A sacarificação ocorreu durante 96 horas em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,8 a 60 °C a 200 rpm. Experimento realizado em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

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} em três concentrações de proteínas (1%, 5% e 10%) do total do extrato (10mg/g). A sacarificação ocorreu durante 96 horas, em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4.8 a 60 °C a 200 rpm. Experimento realizado em duplicata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

8.5. CONCLUSÕES

Dentre as seis endo-xilanases potenciais avaliadas para suplementar do coquetel enzimático de *T. aurantiacus* CBMAI 756, a enzima mutante XAT^{M12} desenvolvida com 12 mutações para aumentar a termoestabilidade se mostrou mais eficiente. Essa enzima aumentou a liberação de xilose em 16,5% ao suplementar na proporção de 10% do total de proteínas do coquetel enzimático no tempo de 96 horas de sacarificação do bagaço BD.

Portanto o eficiente arsenal hemicelulolítico de *T. aurantiacus* pode ser melhorado com a adição uma endo-xilanase termoestável, pertencente a família GH11, ausente em seu repertório enzimático. Assim a enzima mutante XAT^{M12} foi identificada como um importante alvo para ser inserido na maquinaria enzimática do fungo *T. aurantiacus* para aumentar sua capacidade em sacarificar a hemicelulose.

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.
- BELÉN, 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, 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. p. 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.; VIIKARI, 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.; VIIKARI, 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.