Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Clonagem, expressão e caracterização de três enzimas hidrolíticas
de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na desconstrução de bagaço
de cana-de-açúcar**

Aline Vianna Bernardi

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2021

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Clonagem, expressão e caracterização de três enzimas hidrolíticas
de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na desconstrução de bagaço
de cana-de-açúcar**

Aline Vianna Bernardi

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutor em Ciências, Área: **Química**

Orientadora: Profa. Dra. Taisa Magnani Dinamarco

RIBEIRÃO PRETO-SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bernardi, Aline Vianna

Clonagem, expressão e caracterização de três enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na desconstrução de bagaço de cana-de-açúcar. Ribeirão Preto, 2021.

317p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Dinamarco, Taisa Magnani.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Lignocelulose. 3. Endoglucanase. 4. Celobiohidrolase. 5. Xilanase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BERNARDI, Aline Vianna

Título: Clonagem, expressão e caracterização de três enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na desconstrução de bagaço de cana-de-açúcar

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título
de Doutor em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Renata e José Roberto, e aos meus irmãos, Ana Flávia e Pedro, pelo amor incondicional, apoio e incentivo em todos os momentos.

Eu amo muito vocês!

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que fizeram parte da minha vida durante esses quatro longos anos de doutorado e cada uma delas, à sua maneira, contribuiu para o resultado final deste trabalho. Eu espero conseguir agradecer a todos.

O meu primeiro e maior agradecimento é à minha orientadora, **Profa. Taisa Magnani Dinamarco**. Agradeço imensamente pela confiança de sempre, pela paciência, pelo incentivo e por todos os conhecimentos transmitidos durante esses anos.

Eu também agradeço:

Aos meus pais, **Renata e José Roberto**, que nunca mediram esforços para realizar todos os meus sonhos. Agradeço pelo amor incondicional, por todo apoio, dedicação e incentivo em todos os momentos. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida.

Aos meus irmãos e melhores amigos, **Ana Flávia e Pedro**, pela cumplicidade, pelo companheirismo e por todo apoio e incentivo em todos os momentos. A nossa união me fortalece nos momentos mais difíceis e eu sei que poderei sempre contar com vocês.

Aos meus avós, **Maria Celina e Décio**, por todo amor, preocupação e apoio em todos os momentos. Agradeço também à minha avó **Benilda** e ao meu avô **José Luiz**, que não estão mais comigo fisicamente, mas que sempre zelaram tanto por mim. Hoje eu os carrego no coração e nas inúmeras lembranças maravilhosas.

Ao meu marido, **Fabio**, por todo amor, carinho e companheirismo. Mesmo à distância, você me apoiou durante toda a minha trajetória até aqui.

À minha filhota de quatro patas, **Lindinha**, que faz com que eu me sinta a pessoa mais especial do mundo todos os dias. Minha companheirinha em todos os momentos, que está sempre ao meu lado (literalmente).

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Biotecnologia de Proteínas: **Lucas, Deborah, Paula e Luis**. Agradeço pela amizade sincera construída ao longo desses anos de

convivência, pelos inúmeros momentos de descontração e também pelas discussões pertinentes aos experimentos.

Ao meu amigo do coração, **Emerson**, pela amizade sincera, pelas boas risadas e pelos momentos de desabafo. Também não posso deixar de agradecer pelas inúmeras análises de sequenciamento realizadas no Laboratório de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da FCFRP.

Às minhas grandes amigas da FCFRP: **Juliana, Lais, Júlia e Dhara**. Tenho muita sorte por tê-las em minha vida e por sempre poder compartilhar com vocês momentos de alegria, descontração e desabafos.

À amiga do coração, **Camila**, que a graduação em Química me deu. Agradeço por se fazer presente mesmo à distância, me apoiando emocionalmente e me incentivando. Sei que poderei contar com você por toda vida.

Ao **Prof. Sérgio Akira Uyemura** que, com a maior gentileza, abriu as portas do seu laboratório para mim e disponibilizou equipamentos, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira**, por todo apoio científico e pela ajuda com os experimentos de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência.

Aos funcionários do Departamento de Química da FFCLRP.

Ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Química da FFCLRP.

Às agências de fomento FAPESP, Capes e CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos os familiares e amigos que, embora não citados, sempre torceram por mim e são essenciais em minha vida.

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar as pessoas. Cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

Resumo

RESUMO

BERNARDI, A. V. **Clonagem, expressão e caracterização de três enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* envolvidas na desconstrução de bagaço de cana-de-açúcar.** 2021. 317f. Tese (doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A lignocelulose representa a fonte de carbono renovável mais abundante da Terra, a partir da qual bioprodutos de alto valor agregado, como o etanol 2G, podem ser obtidos. Contudo, devido à elevada recalcitrância imposta pela complexa associação entre celulose, hemicelulose e lignina, grandes quantidades de enzimas do tipo CAZymes são necessárias para a conversão eficiente em açúcares fermentáveis. Os preços elevados dessas enzimas correspondem hoje a mais de 15% dos custos totais envolvidos no processamento da biomassa, sendo portanto um dos principais entraves para a implementação de biorrefinarias lignocelulósicas em larga escala e de forma economicamente viável. A bioprospecção de enzimas mais robustas para aplicações industriais pode contribuir para a otimização dos coquetéis enzimáticos, maximizando os rendimentos dos produtos e, simultaneamente, reduzindo os custos do processo. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar as propriedades bioquímicas e cinéticas de três enzimas hidrolíticas de *A. fumigatus* Af293 – uma endoglucanase GH7 (*Af-EGL7*), uma celobiohidrolase GH6 (*AfCel6A*) e uma xilanase GH10 (*Af-XYLA*) – as quais foram identificadas pelo nosso grupo de pesquisa em secretoma e transcriptoma, quando o fungo foi cultivado na presença de bagaço de cana-de-açúcar explodido (SEB). Para tanto, o gene *Af-egl7* foi clonado nos respectivos vetores pET-28a(+) e pPICZαA para expressão heteróloga em *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS e *P. pastoris* X-33. Os genes *Afcel6A* e *Af-xylA*, por sua vez, foram expressos somente em *P. pastoris* X-33. A endoglucanase *Af-EGL7* produzida em dois sistemas de expressão diferentes apresentou propriedades enzimáticas bem distintas, principalmente em termos de estabilidade e eficiência catalítica. As condições ótimas de temperatura e pH foram as mesmas em ambos os casos – 55 °C e pH 5,0 – assim como a tolerância a diferentes aditivos presentes no meio reacional. Embora substancialmente menos ativa, a *Af-EGL7* produzida em bactéria foi capaz de atuar sinergicamente com o coquetel Celluclast[®] 1.5L durante a degradação de SEB, e, assim, promover aumentos consideráveis nos percentuais de açúcares redutores liberados. Similarmente, a *Af-EGL7* expressa em *P. pastoris* exibiu sinergismo com o coquetel comercial sobre esse e outros resíduos lignocelulósicos. A celobiohidrolase *AfCel6A* exibiu atividade máxima entre 55-60 °C e pH 5,5-6,0. Essa enzima apresentou estabilidade considerável em diferentes condições de temperatura e pH, além de alta resistência à inibição por glicose em concentrações de até 250 mM. A *AfCel6A* atuou em sinergia tanto com o coquetel quanto com a *Af-EGL7* na degradação de CM-Celulose e biomassas mais complexas, o que resultou em rendimentos de hidrólise muito superiores em comparação ao controle. Para a xilanase *Af-XYLA*, o melhor desempenho foi alcançado a 80 °C e na faixa de pH de 5,0-7,0. Os parâmetros cinéticos da *Af-XYLA* sobre xilana foram muito superiores aos reportados na literatura para outras xilanases GH10 fúngicas. A *Af-XYLA* demonstrou elevada tolerância aos açúcares glicose e xilose em concentrações de até 250 mM, além de estabilidade considerável a diferentes temperaturas e pH. Similarmente ao observado para as duas celulasas recombinantes, o alto grau de sinergismo entre a *Af-XYLA* e as celulasas comerciais intensificou substancialmente a liberação de açúcares redutores a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Juntos, os resultados obtidos apontaram essas três enzimas recombinantes como potenciais alvos para aplicações em biorrefinarias lignocelulósicas.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, lignocelulose, endoglucanase, celobiohidrolase, xilanase

Abstract

ABSTRACT

BERNARDI, A. V. **Cloning, expression and characterization of three hydrolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* involved in the deconstruction of sugarcane bagasse.** 2021. 317f. Tese (doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Lignocellulose represents the most abundant renewable carbon source on Earth, from which high value-added bioproducts, such as 2G ethanol, can be obtained. However, due to the high recalcitrance imposed by complex association between cellulose, hemicellulose and lignin, large amounts of CAZymes are needed for an efficient conversion into fermentable sugars. The high prices of these enzymes currently account for more than 15% of the total costs involved in biomass processing, being therefore one of the main obstacles to the economically feasible implementation of large-scale lignocellulosic biorefineries. Bioprospecting for more robust enzymes for industrial applications can contribute to the optimization of enzyme cocktails, maximizing product yields and, simultaneously, reducing process costs. In this context, the aim of the present work was to characterize the biochemical and kinetic properties of three hydrolytic enzymes from *A. fumigatus* Af293 – a GH7 endoglucanase (*Af-EGL7*), a GH6 cellobiohydrolase (*AfCel6A*) and a GH10 xylanase (*Af-XYLA*) – which were identified by our research group on secretome and transcriptome, when the fungus was cultivated in the presence of sugarcane exploded bagasse (SEB). For this purpose, *Af-egl7* gene was cloned into the respective vectors pET-28a(+) and pPICZαA for heterologous expression in *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS and *P. pastoris* X-33. *Afcel6A* and *Af-xylA* genes were expressed only in *P. pastoris* X-33. *Af-EGL7* endoglucanase produced in two different expression systems showed very distinct enzymatic properties, mainly in terms of stability and catalytic efficiency. The optimal conditions of temperature and pH were the same in both cases – 55 °C and pH 5.0 – as well as the tolerance to different additives present in the reaction mixture. Although substantially less active, *Af-EGL7* produced in bacteria was able to act synergistically with the Celluclast[®]1.5L cocktail during SEB degradation and thus promote considerable increases in the percentage of reducing sugars released. Similarly, *Af-EGL7* expressed in *P. pastoris* exhibited synergism with the commercial cocktail on this and other lignocellulosic residues. *AfCel6A* cellobiohydrolase exhibited maximal activity between 55-60 °C and pH 5.5-6.0. This enzyme showed considerable stability under different conditions of temperature and pH, in addition to high resistance to inhibition by glucose at concentrations up to 250 mM. *AfCel6A* acted synergistically with both cocktail and *Af-EGL7* on the degradation of CM-Cellulose and more complex biomasses, which resulted in much higher hydrolysis yields compared to the control. For *Af-XYLA* xylanase, the best performance was achieved at 80 °C and in the pH range 5.0-7.0. *Af-XYLA* kinetic parameters on xylan were much higher than those reported in the literature for other fungal GH10 xylanases. *Af-XYLA* showed high tolerance to glucose and xylose at concentrations up to 250 mM, in addition to considerable stability at different temperatures and pH. Similar to what was observed for the two recombinant cellulases, the high degree of synergism between *Af-XYLA* and commercial cellulases substantially boosted the release of reducing sugars from pretreated sugarcane bagasse. Together, the results obtained indicated these three recombinant enzymes as potential targets for applications in lignocellulosic biorefineries.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, lignocellulose, endoglucanase, cellobiohydrolase, xylanase

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Bioprodutos de alto valor agregado que podem ser obtidos a partir do processamento da lignocelulose nas biorrefinarias.....	4
Figura 2 –	Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica.....	5
Figura 3 –	Estrutura química da celulose.....	7
Figura 4 –	Estruturas químicas de diferentes tipos de hemiceluloses.....	8
Figura 5 –	Estrutura química da lignina.....	9
Figura 6 –	Esquema representativo da desconstrução da lignocelulose mediante a ação de CAZymes.....	12
Figura 7 –	Representação do processo enzimático de despolimerização da celulose.....	13
Figura 8 –	Representação do processo enzimático de despolimerização da xilana.....	14
Figura 9 –	Análises de sequência e estrutura da <i>Af-EGL7</i>	55
Figura 10 –	Eletroforese em gel de agarose 1% após amplificação do gene <i>Af-egl7</i> com os <i>primers</i> para clonagem em pET-28a(+)......	57
Figura 11 –	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de <i>E. coli</i> DH10 β transformadas com o produto da ligação do inserto <i>Af-egl7</i> no vetor pGEM [®] -T Easy.....	58
Figura 12 –	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de <i>E. coli</i> Rosetta [™] (DE3) pLysS transformadas com o produto da ligação do inserto <i>Af-egl7</i> no vetor pET-28a(+)......	59
Figura 13 –	Análise por SDS-PAGE da <i>Af-EGL7</i> após expressão e purificação dos corpos de inclusão.....	60
Figura 14 –	Análises de zimograma da <i>Af-EGL7</i>	61
Figura 15 –	Atividade e estabilidade da <i>Af-EGL7</i> em diferentes condições reacionais.....	63
Figura 16 –	Avaliação do sinergismo entre a <i>Af-EGL7</i> e o coquetel Celluclast [®] 1.5L durante a hidrólise de SEB.....	70
Figura 17 –	Eletroforese em gel de agarose 1% após amplificação do gene <i>Af-egl7</i> com os <i>primers</i> para clonagem em pPICZ α A.....	72

Figura 18 –	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de <i>E. coli</i> DH10 β transformadas com o produto da clonagem do inserto <i>Af-egl7</i> no vetor pPICZ α A por CPEC.....	73
Figura 19 –	Resultado do teste de atividade enzimática realizado em placa de Petri para 24 colônias de <i>P. pastoris</i> X-33 transformadas com o vetor recombinante <i>Af-egl7/pPICZαA</i>	74
Figura 20 –	Análises por SDS-PAGE da <i>Af-EGL7</i> após a) purificação e b) deglicosilação.....	75
Figura 21 –	Estabilidade da <i>Af-EGL7</i>	79
Figura 22 –	Efeito de glicose e celobiose sobre a atividade da <i>Af-EGL7</i>	80
Figura 23 –	Avaliação do sinergismo entre a <i>Af-EGL7</i> e o coquetel Celluclast [®] 1.5L durante a hidrólise de diferentes resíduos agrícolas.....	84
Figura 24 –	Estrutura tridimensional da <i>AfCel6A</i>	87
Figura 25 –	Eletroforese em gel de agarose 1% após amplificação do gene <i>Afcel6A</i> com os <i>primers</i> para clonagem em pPICZ α A.....	88
Figura 26 –	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de <i>E. coli</i> DH10 β transformadas com o produto da clonagem do inserto <i>Afcel6A</i> no vetor pPICZ α A por CPEC.....	89
Figura 27 –	Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de <i>P. pastoris</i> X-33 transformadas com o vetor recombinante <i>Afcel6A/pPICZαA</i>	90
Figura 28 –	Análises por SDS-PAGE da <i>AfCel6A</i> após a) purificação e b) deglicosilação.....	91
Figura 29 –	Atividade e estabilidade da <i>AfCel6A</i> em diferentes condições reacionais.....	94
Figura 30 –	Efeito de glicose e celobiose sobre a atividade da <i>AfCel6A</i>	102
Figura 31 –	Avaliação do sinergismo entre a) <i>AfCel6A</i> e Celluclast [®] 1.5L ou b) <i>AfCel6A</i> e <i>Af-EGL7</i> durante a hidrólise de CMC.....	104
Figura 32 –	Avaliação do sinergismo entre a) Celluclast [®] 1.5L e <i>AfCel6A</i> na proporção 1:1 e b) <i>Af-EGL7</i> e <i>AfCel6A</i> na proporção 1:10 sobre diferentes resíduos agrícolas.....	106
Figura 33 –	Análises de a) sequência e b) estrutura da <i>Af-XYLA</i>	110

Figura 34 –	Eletoforese em gel de agarose 1% após amplificação do gene <i>Af-xyIA</i> com os <i>primers</i> para clonagem em pPICZαA.....	112
Figura 35 –	Eletoforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de <i>E. coli</i> DH10β transformadas com o produto da clonagem do inserto <i>Af-xyIA</i> no vetor pPICZαA por CPEC.....	113
Figura 36 –	Eletoforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de <i>P. pastoris</i> X-33 transformadas com o vetor recombinante <i>Af-xyIA</i> /pPICZαA.....	114
Figura 37 –	Análises por SDS-PAGE da <i>Af-XYLA</i> após a) purificação e b) deglicosilação.....	115
Figura 38 –	Análise de zimograma da <i>Af-XYLA</i>	117
Figura 39 –	Atividade e estabilidade da <i>Af-XYLA</i> em diferentes condições reacionais.....	120
Figura 40 –	Análises estruturais da <i>Af-XYLA</i> por dicroísmo circular (DC) e espectroscopia de fluorescência (ITFE) após pré-incubação da enzima em diferentes temperaturas.....	128
Figura 41 –	Efeito dos açúcares glicose e xilose (a) e de etanol (b) sobre a atividade da <i>Af-XYLA</i>	133
Figura 42 –	Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados para o rendimento de açúcares redutores (%) a partir da hidrólise de SEB.....	137
Figura 43 –	Gráficos de superfície de resposta 3D mostrando os efeitos de a) Celluclast®1.5L e Tween 20, b) <i>Af-XYLA</i> e Tween 20 e c) <i>Af-XYLA</i> e Celluclast®1.5L sobre a produção de açúcares redutores a partir de SEB.....	139
Figura 44 –	Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados para o rendimento de açúcares redutores (%) a partir da hidrólise de SDB.....	141
Figura 45 –	Gráfico de superfície de resposta 3D mostrando os efeitos de Celluclast®1.5L e <i>Af-XYLA</i> sobre a produção de açúcares redutores a partir de SDB.....	142
Figura 46 –	Avaliação do sinergismo entre a <i>Af-XYLA</i> e o coquetel Celluclast®1.5L durante as hidrólises de a) SEB e b) SDB.....	143

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos <i>primers</i> que foram utilizados na amplificação do gene <i>Af-egl7</i> para posterior clonagem no vetor pET-28a(+)	31
Tabela 2 – Sequências dos <i>primers</i> que foram utilizados na amplificação e na clonagem dos genes <i>Af-egl7</i> , <i>Afcel6A</i> e <i>Af-xylA</i> no vetor pPICZαA pelo método CPEC	37
Tabela 3 – Valores codificados e reais dos níveis das variáveis independentes	50
Tabela 4 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes endoglucanases GH7 fúngicas	64
Tabela 5 – Efeito de íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade da <i>Af-EGL7</i>	66
Tabela 6 – Efeito de diferentes concentrações de Mn^{2+} sobre a atividade da <i>Af-EGL7</i>	66
Tabela 7 – Atividades relativas (%) da <i>Af-EGL7</i> sobre diferentes substratos	68
Tabela 8 – Parâmetros cinéticos da <i>Af-EGL7</i> na presença de Mn^{2+} 5 mM	69
Tabela 9 – Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} sobre a atividade da <i>Af-EGL7</i>	81
Tabela 10 – Parâmetros cinéticos obtidos para a <i>Af-EGL7</i> expressa em <i>Pichia pastoris</i> sobre os substratos CMC, β-glucana e Xiloglucana	82
Tabela 11 – Composição lignocelulósica de diferentes resíduos agroindustriais	85
Tabela 12 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes celobiohidrolases GH6 fúngicas	95
Tabela 13 – Efeito de íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade da <i>AfCel6A</i>	100
Tabela 14 – Atividades relativas (%) da <i>AfCel6A</i> sobre diferentes substratos	103
Tabela 15 – Parâmetros cinéticos obtidos para a <i>AfCel6A</i> sobre o substrato CMC	103
Tabela 16 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes xilanases GH10 fúngicas	121
Tabela 17 – Estimativa das estruturas secundárias da <i>Af-XYLA</i> após pré-incubação a 25-90 °C por 30 minutos	128
Tabela 18 – Comprimentos de onda máximos ($\lambda_{máx}$) e suas respectivas intensidades de fluorescência	129

Tabela 19 –	Efeito de íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade da <i>Af</i> -XYLA.....	130
Tabela 20 –	Atividades relativas (%) da <i>Af</i> -XYLA sobre diferentes substratos.....	134
Tabela 21 –	Parâmetros cinéticos obtidos para a <i>Af</i> -XYLA sobre o substrato xilana a 50 e 80 °C.....	135
Tabela 22 –	Matriz do DCCR 2 ³ e valores experimentais para a otimização das hidrólises de SEB e SDB.....	136
Tabela 23 –	ANOVA do modelo ajustado de segunda-ordem que descreve a liberação de açúcares redutores a partir de SEB como uma função de 3 variáveis independentes.....	138
Tabela 24 –	Composição lignocelulósica de SEB e SDB.....	140
Tabela 25 –	ANOVA do modelo ajustado de segunda-ordem que descreve a liberação de açúcares redutores a partir de SDB como uma função de 3 variáveis independentes.....	141

Lista de abreviaturas e siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μF	Microfarad
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
1G	Primeira Geração
2G	Segunda Geração
3D	Tridimensional
AA	Atividades Auxiliares
ANOVA	Analysis Of Variance
AOX	Álcool Oxidase
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
BrEt	Brometo de Etídio
CAZymes	Carbohydrate-Active Enzymes
CBH	Celobiohidrolase
CBM	Carbohydrate-Binding Modules
CBP	Consolidated Bioprocessing
cDNA	DNA complementar
CE	Carboidrato Esterases
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
CNPG ₃	2-cloro-p-nitrofenil-α-D-maltotriosídeo
CPEC	Circular Polymerase Extension Cloning
D.I.T.	Digital Integration Time
D.O.	Densidade Óptica
DC	Dicroísmo Circular
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAg	DNA genômico
DNS	Dinitrosalicílico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

DoE	Design of Experiments
DTT	Ditiotreitol
EC	Enzyme Comission
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Endo H	Endoglicosidase H
F	Forward
FPU	Filter Paper Unit
g	Grama
GEE	Gases de Efeito Estufa
GH	Glicosil Hidrolases
GT	Glicosil Transferases
h	Hora
HiFi	High Fidelity
His ₆	Cauda de afinidade contendo 6 histidinas
HMF	Hidroximetilfurfural
IC ₅₀	Half maximal Inhibitory Concentration
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
ITFE	Intrinsic Tryptophan Fluorescence Emission
kb	Quilobases
k_{cat}	Número de renovação ou de <i>turnover</i>
k_{cat}/K_M	Eficiência catalítica
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
kgf	Quilograma-força
K _M	Constante de Michaelis-Menten
kV	Quilovolt
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LPMO	Lytic Polysaccharide Monooxygenase
LVAX	Low Viscosity Arabinoxylan
M	Molar (mol L ⁻¹)
mdeg	Miligras
Meio TB	Terrific-Broth
mg	Miligrama

Min	Minuto
Miniprep	Minipreparação Plasmidial
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico
MRW	Mean Residue Weight
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
Mut ⁺	Methanol Utilization Plus
Mut ^s	Methanol Utilization Slow
Mut ⁻	Methanol Utilization Minus
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ORF	Open Reading Frame
p/v	Relação peso/volume
P _{AOX1}	Promotor da Álcool Oxidase 1
PASC	Phosphoric Acid Swollen Cellulose
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCWD	Plant Cell Wall Degrading
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PL	Polissacarídeo Liases
PMID	PubMed unique Identifier
pNPC	p-Nitrofenil-β-D-celobiosídeo
R	Reverse
rpm	Rotações Por Minuto
s	Segundo
SDB	Sugarcane Delignified Bagasse
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SEB	Sugarcane Exploded Bagasse
SIN	Sistema Interligado Nacional

SLS	Lauril sulfato de sódio
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal broth with Catabolites repression
Solução TB	Transformation Buffer
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
T_m	Melting temperature
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
TWh	Terawatt-hora
U	Unidade de atividade enzimática
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar
V	Volt
v/v	Relação volume/volume
$V_{máx}$	Velocidade máxima
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
XO	Xilooligossacarídeo
YAG	Yeast extract-Agar-Glucose
YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose
YPDS	Yeast extract-Peptone-Dextrose-Sorbitol

Lista de símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
\$	Símbolo de dólar
°C	Grau Celsius
TM	<i>Trademark</i>
®	Marca registrada
g	Força centrífuga relativa
Ω	Resistência elétrica (ohm)
λ	Comprimento de onda
ε	Coefficiente de extinção molar
$\Delta\varepsilon$	Diferença entre coeficientes de extinção molar
Θ	Elipticidade
p	Probabilidade de significância
α (estatística)	Valor limite contra o qual o valor p é medido; associado ao nível de confiança
R^2	Coefficiente de determinação

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	CENÁRIO ENERGÉTICO GLOBAL.....	2
1.2	ETANOL DE 1ª E 2ª GERAÇÃO NO BRASIL.....	2
1.3	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	3
1.3.1	Celulose.....	6
1.3.2	Hemicelulose.....	7
1.3.3	Lignina.....	8
1.4	SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	9
1.4.1	Enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes).....	10
1.4.1.1	Celulases: endoglucanases e celobiohidrolases.....	14
1.4.1.2	Hemicelulases: xilanases.....	16
1.4.2	Bioprospecção de novas enzimas hidrolíticas.....	17
1.5	SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.....	21
1.5.1	<i>Escherichia coli</i>: um clássico hospedeiro procarioto.....	22
1.5.2	<i>Pichia pastoris</i>: um eficiente hospedeiro eucarioto.....	23
2	OBJETIVOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	MICROORGANISMOS, MEIOS DE CULTIVO E PLASMÍDEOS.....	29
3.2	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA.....	30
3.3	EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>E. coli</i> , PURIFICAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE E <i>REFOLDING</i>	31
3.3.1	Desenho dos <i>primers</i>.....	31
3.3.2	Amplificação por PCR.....	31
3.3.3	Preparo de células de <i>E. coli</i> quimiocompetentes.....	32
3.3.4	Clonagem do gene <i>Af-egl7</i> no vetor pGEM®-T Easy, transformação de <i>E. coli</i> DH10β e <i>screening</i> dos clones recombinantes.....	32
3.3.5	PCR de colônia e Miniprep.....	33
3.3.6	Análise do gene <i>Af-egl7</i> por sequenciamento.....	34
3.3.7	Digestão e clonagem do gene <i>Af-egl7</i> no vetor pET-28a(+)......	34
3.3.8	Transformação de <i>E. coli</i> Rosetta™ (DE3) pLysS.....	34

3.3.9	Expressão heteróloga da endoglucanase <i>Af-EGL7</i> em <i>E. coli</i> Rosetta™ (DE3) pLysS.....	34
3.3.10	Purificação dos corpos de inclusão e <i>refolding</i>	35
3.4	EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>P. pastoris</i> E PURIFICAÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES.....	37
3.4.1	Desenho dos <i>primers</i>	37
3.4.2	Amplificação por PCR.....	37
3.4.3	Clonagem dos genes <i>Af-egl7</i> , <i>Afcel6A</i> e <i>Af-xylA</i> no vetor pPICZaA, transformação de <i>E. coli</i> DH10β competente e sequenciamento.....	38
3.4.4	Transformação de <i>P. pastoris</i> competente.....	38
3.4.4.1	Preparo de células eletrocompetentes.....	38
3.4.4.2	Transformação por eletroporação.....	39
3.4.4.3	<i>Screening</i> de clones positivos.....	39
3.4.5	Expressão heteróloga das enzimas <i>Af-EGL7</i> , <i>AfCel6A</i> e <i>Af-XYLA</i> em <i>P. pastoris</i> X-33.....	40
3.4.6	Purificação das enzimas recombinantes por cromatografia de afinidade.....	40
3.5	ANÁLISES DE SEQUÊNCIA E ESTRUTURA.....	41
3.6	DEGLICOSILAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS EM <i>P. pastoris</i>	41
3.7	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA <i>Af-EGL7</i> , <i>AfCel6A</i> e <i>Af-XYLA</i> ATRAVÉS DO MÉTODO DNS.....	42
3.8	ZIMOGRAMA DAS ENZIMAS <i>Af-EGL7</i> e <i>Af-XYLA</i>	42
3.9	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DAS ENZIMAS <i>Af-EGL7</i> , <i>AfCel6A</i> e <i>Af-XYLA</i>	43
3.9.1	pH e temperatura ótimos.....	43
3.9.2	Estabilidade a diferentes condições de pH e temperatura.....	43
3.9.3	Efeito da adição de metais e reagentes.....	44
3.9.4	Atividade enzimática na presença de produtos reacionais.....	44
3.9.5	Especificidade por diferentes substratos.....	45
3.10	ANÁLISES ESTRUTURAIS DA <i>Af-XYLA</i> POR DICROÍSMO CIRCULAR E ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	45
3.11	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS <i>Af-EGL7</i> , <i>AfCel6A</i> e <i>Af-XYLA</i>	46

3.12	ENSAIOS DE SINERGISMO.....	47
3.12.1	Efeito da associação entre o coquetel Celluclast®1.5L e a <i>Af</i> -EGL7 de <i>A. fumigatus</i> produzida em <i>E. coli</i> sobre a sacarificação de SEB.....	47
3.12.2	Efeito da associação entre o coquetel Celluclast®1.5L e a <i>Af</i> -EGL7 de <i>A. fumigatus</i> produzida em <i>P. pastoris</i> sobre a sacarificação de diferentes resíduos agroindustriais.....	48
3.12.3	Efeito da associação entre ambas <i>Af</i> -EGL7 e <i>Af</i> Cel6A de <i>A. fumigatus</i> produzidas em <i>P. pastoris</i> sobre a sacarificação de celulose.....	48
3.12.4	Efeito da associação entre o coquetel Celluclast®1.5L e a <i>Af</i> Cel6A de <i>A. fumigatus</i> produzida em <i>P. pastoris</i> sobre a sacarificação de celulose.....	48
3.12.5	Efeito da associação entre <i>Af</i> Cel6A e <i>Af</i> -EGL7, ou entre <i>Af</i> Cel6A e Celluclast®1.5L, sobre a sacarificação de diferentes resíduos agroindustriais.....	49
3.12.6	Avaliação do sinergismo entre o coquetel Celluclast®1.5L e a <i>Af</i> -XYLA recombinante de <i>A. fumigatus</i> produzida em <i>P. pastoris</i> durante a sacarificação das biomassas pré-tratadas SEB e SDB.....	49
3.12.6.1	Aplicação de DCCR associado a MSR como abordagem estatística para otimizar a sacarificação de SEB e SDB.....	49
3.12.6.2	Efeito da associação entre o coquetel e a <i>Af</i> -XYLA sobre os rendimentos de hidrólise de SEB e SDB.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA ENDO-1,4- β -GLUCANASE GH7 DE <i>Aspergillus fumigatus</i> E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO INDUSTRIAL.....	53
4.1.1	Análises de sequência e estrutura da <i>Af</i> -EGL7.....	53
4.1.2	Amplificação e clonagem do gene <i>Af-egl7</i>	57
4.1.3	Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> Rosetta™ (DE3) pLysS, purificação dos corpos de inclusão e zimograma.....	59
4.1.4	Caracterização bioquímica e cinética da <i>Af</i> -EGL7.....	61
4.1.4.1	Determinação das condições reacionais ótimas e estabilidade a diferentes temperaturas e pH.....	61
4.1.4.2	Efeito de diferentes íons e reagentes químicos sobre a atividade da <i>Af</i> -EGL7.....	66

4.1.4.3	Avaliação da especificidade da Af-EGL7 por diferentes substratos e determinação dos seus parâmetros cinéticos.....	67
4.1.5	Desempenho da Af-EGL7 associada ao coquetel Celluclast®1.5L durante a sacarificação de SEB.....	69
4.2	UMA ENDOGLUCANASE GH7 TERMOESTÁVEL DE <i>Aspergillus fumigatus</i> , SUPEREXPRESSA EM <i>Pichia pastoris</i> , ESTIMULA A HIDRÓLISE DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS.....	71
4.2.1	Amplificação e clonagem do gene <i>Af-egl7</i>.....	72
4.2.2	Expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> X-33, purificação da enzima recombinante e deglicosilação.....	74
4.2.3	Caracterização bioquímica e cinética da Af-EGL7 produzida em <i>P. pastoris</i>.....	76
4.2.3.1	Ensaio de estabilidade a diferentes temperaturas e pH.....	76
4.2.3.2	Efeito de produtos reacionais e de diferentes concentrações de Cu ²⁺ sobre a atividade da Af-EGL7.....	79
4.2.3.3	Determinação dos parâmetros cinéticos da Af-EGL7.....	81
4.2.4	Desempenho da Af-EGL7 associada ao coquetel Celluclast®1.5L durante a sacarificação de diferentes biomassas lignocelulósicas.....	82
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA AfCel6A.....	85
4.3.1	Análises de sequência e estrutura da AfCel6A.....	85
4.3.2	Amplificação e clonagem do gene <i>Afcel6A</i>.....	87
4.3.3	Expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> X-33, purificação da enzima recombinante e deglicosilação.....	91
4.3.4	Caracterização bioquímica e cinética da AfCel6A.....	93
4.3.4.1	Determinação das condições reacionais ótimas e estabilidade a diferentes temperaturas e pH.....	93
4.3.4.2	Efeito de diferentes aditivos e produtos reacionais sobre a atividade da AfCel6A.....	100
4.3.4.3	Avaliação da especificidade da AfCel6A por diferentes substratos e determinação dos seus parâmetros cinéticos.....	102
4.3.5	Ensaio de sinergismo.....	103
4.3.5.1	Desempenho da AfCel6A associada ao coquetel ou à Af-EGL7 durante a sacarificação de CMC.....	104

4.3.5.2	Desempenho da <i>Af</i> Cel6A associada ao coquetel ou à <i>Af</i> -EGL7 durante a sacarificação de diferentes biomassas lignocelulósicas.....	105
4.4	UMA XILANASE GH10 TERMOFÍLICA, TOLERANTE AO pH E ALTAMENTE ATIVA DE <i>Aspergillus fumigatus</i> INTENSIFICOU A SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO PELAS CELULASES.....	108
4.4.1	Análises de sequência e estrutura da <i>Af</i>-XYLA.....	108
4.4.2	Amplificação e clonagem do gene <i>Af</i>-xylA.....	111
4.4.3	Expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> X-33, purificação da enzima recombinante e deglicosilação.....	114
4.4.4	Análise de Zimograma: visualização da atividade enzimática da <i>Af</i>-XYLA em gel de poliacrilamida contendo xilana.....	116
4.4.5	Caracterização bioquímica e cinética da <i>Af</i>-XYLA.....	117
4.4.5.1	Determinação das condições reacionais ótimas e estabilidade a diferentes temperaturas e pH.....	117
4.4.5.2	Efeito de diferentes aditivos e produtos reacionais sobre a atividade da <i>Af</i> -XYLA.....	130
4.4.5.3	Avaliação da especificidade da <i>Af</i> -XYLA por diferentes substratos e determinação dos seus parâmetros cinéticos.....	133
4.4.6	Otimização de alguns dos principais parâmetros envolvidos na sacarificação enzimática visando melhores rendimentos de açúcares.....	135
4.4.6.1	Otimização da hidrólise de SEB.....	136
4.4.6.2	Otimização da hidrólise de SDB.....	140
4.4.7	Desempenho da <i>Af</i>-XYLA associada ao coquetel Celluclast®1.5L durante a sacarificação de SEB e SDB.....	142
5	CONCLUSÕES.....	144
	REFERÊNCIAS.....	147
	APÊNDICES.....	176
	APÊNDICE A – Meios de cultura.....	177
	APÊNDICE B – Soluções e tampões.....	181
	APÊNDICE C – Resultados dos sequenciamentos (sequências traduzidas).....	186
	ANEXOS	190

ANEXO A – Mapas de vetores.....	191
ANEXO B – Artigos científicos publicados.....	197

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 CENÁRIO ENERGÉTICO GLOBAL

A exploração em massa de recursos naturais não-renováveis (petróleo, gás natural, carvão mineral) como fontes de energia teve início há mais de 200 anos e, atualmente, atende a aproximadamente 87% da necessidade energética mundial (ABRAHAM *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2015). Ainda que a pandemia de Covid-19 tenha impactado temporariamente o consumo de energia, o aumento do mesmo irá inevitavelmente ocorrer nos próximos anos em decorrência da expansão populacional e do desenvolvimento econômico (NOVACANA, 2021; SU *et al.*, 2020; VENKATA MOHAN *et al.*, 2019). Atreladas a essa demanda crescente, somam-se duas principais questões: de um lado, o esgotamento inevitável das reservas de combustíveis fósseis e, de outro, a necessidade urgente de mitigar as emissões de gases de efeito estufa (GEE) para a atmosfera e, assim, controlar o aquecimento global (CUNHA *et al.*, 2019; HOSSEINI KOUAIE *et al.*, 2019; FATMA *et al.*, 2018). Todos esses fatores tem impulsionado cada vez mais investimentos na produção de energia a partir de biomassas ou outras fontes renováveis (por exemplo: solar, eólica, hídrica, geotérmica) (ABRAHAM *et al.*, 2020; TOOR *et al.*, 2020; BERNARDI *et al.*, 2019). Uma vez que aproximadamente 16% das emissões globais de GEE provêm do setor de transportes, a substituição dos combustíveis à base de petróleo por biocombustíveis poderá contribuir consideravelmente para solucionar todas essas questões e promover segurança energética (GLASGOW *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2020; HOSSEINI KOUAIE *et al.*, 2019; FATMA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2015).

1.2 ETANOL DE 1ª E 2ª GERAÇÃO NO BRASIL

Apesar de existirem diferentes tipos de biocombustíveis (biodiesel, biogás, biobutanol, biohidrogênio), o bioetanol de primeira geração (1G) é, predominantemente, o mais utilizado, com uma produção global de mais de 97,8 bilhões de litros ao ano (TOOR *et al.*, 2020; CARPIO & SOUZA, 2019). Nesse cenário, o Brasil ocupa uma posição de destaque, sendo o maior produtor mundial de etanol a partir da cana-de-açúcar, contribuindo com mais de 27% para o total mencionado acima (CORTEZ *et al.*, 2020; CARPIO & SOUZA, 2019; NEVES *et al.*, 2016). Mais especificamente, de acordo com os dados da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), o país produziu, na safra de 2020/2021, cerca de 657 milhões de toneladas de cana-

de-açúcar: insumo esse que foi utilizado para gerar 32,5 bilhões de litros de etanol total, além de 41,5 milhões de toneladas de açúcar e 22,6 TWh de bioeletricidade (UNICADATA). Atualmente, quase a totalidade desse volume de etanol produzido é de primeira geração – uma tecnologia que envolve a fermentação alcoólica, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da sacarose presente no caldo extraído dos colmos da cana-de-açúcar (de GOUVÊA *et al.*, 2018; BORIN *et al.*, 2015). Entretanto, a perspectiva de aumento gradual e significativo na demanda por esse biocombustível alavanca a necessidade de investir em outras tecnologias que possam aumentar o desempenho de produção, sendo o etanol de segunda geração (2G) – produzido a partir de biomassas lignocelulósicas – uma das alternativas mais relevantes (ALI *et al.*, 2020; FERREIRA & TAHERZADEH, 2020; BERNARDI *et al.*, 2018; BEZERRA & RAGAUSKAS, 2016; PEREIRA *et al.*, 2015). Estima-se que a associação entre ambas as tecnologias de produção possa aumentar em até 40% o rendimento desse produto, o que atenderá seguramente às necessidades energéticas futuras e ainda poderá contribuir para a maior sustentabilidade do etanol (FERREIRA & TAHERZADEH, 2020; BORIN *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2016; BORIN *et al.*, 2015). O Brasil é, hoje, um dos pioneiros na produção de etanol 2G, com duas plantas industriais operando em escala comercial: Costa Pinto (Raízen) e Bioflex (Granbio), localizadas em Piracicaba (São Paulo) e São Miguel dos Santos (Alagoas), respectivamente (NOVACANA, 2020; OBYDENKOVA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2016). Juntas, as duas usinas produziram 6,1 milhões de litros de etanol lignocelulósico em 2019 (NOVACANA, 2020), um volume ainda bem distante do esperado. Para melhorar os níveis de produção e consolidar o etanol 2G no mercado, é necessário superar alguns obstáculos envolvidos no processo que, por sua vez, são majoritariamente decorrentes da natureza recalcitrante da lignocelulose (FERREIRA & TAHERZADEH, 2020; CHANDEL *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2017), o que será discutido mais detalhadamente nos tópicos a seguir.

1.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica, constituinte-chave da parede celular vegetal, representa a fonte de carbono mais abundante da Terra e a matéria-prima renovável mais promissora para a produção de bioenergia e outros produtos de base biológica (Figura 1) (BERNARDI *et al.*, 2021a; CHEN *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2019a). Materiais lignocelulósicos podem ser obtidos de inúmeras fontes, como lixos municipais e industriais, resíduos de madeira e floresta e, ainda, subprodutos de atividades agrícolas (palha de milho, palha de trigo, palha de arroz, sorgo, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros); dentre esses, o

bagaço de cana-de-açúcar se destaca em países de clima tropical devido à sua maior disponibilidade (ABRAHAM *et al.*, 2020; FATMA *et al.*, 2018; JAIN *et al.*, 2018; NEVES *et al.*, 2016; BATALHA *et al.*, 2015).

Figura 1 – Bioprodutos de alto valor agregado que podem ser obtidos a partir do processamento da lignocelulose nas biorrefinarias

Fonte: figura adaptada de de PAULA *et al.*, 2019.

No caso do Brasil, a cada tonelada de cana-de-açúcar processada para extração do caldo, são gerados cerca de 270-280 kg de bagaço (BRAGA & POLETTTO, 2020; BORIN *et al.*, 2017). Uma parcela desse bagaço é empregada na cogeração de energia para autoconsumo nas usinas sucroalcooleiras, sendo o excedente exportado para o Sistema Interligado Nacional (SIN) para suprir o fornecimento de energia elétrica em períodos de sazonalidade (como no inverno, quando há escassez de chuvas e, portanto, o abastecimento das hidrelétricas é comprometido) (BRAGA & POLETTTO, 2020; GUERRA *et al.*, 2020; BATALHA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015). Contudo, uma fração significativa desse resíduo permanece inexplorada no campo, constituindo um problema ambiental devido aos riscos de combustão espontânea e proliferação de vetores (ABRAHAM *et al.*, 2020; BRAGA & POLETTTO, 2020; BATALHA *et al.*, 2015). Desse modo, o aproveitamento do bagaço para a produção de etanol 2G e derivados químicos

configura uma estratégia vantajosa em muitos sentidos: além de ser um substrato de baixo custo, possibilita aumentar a produtividade do etanol e outros derivados sem a necessidade de expansão das áreas de cultivo; não compete com a indústria alimentícia e, ainda, oferece uma solução para o descarte incorreto desse material (BRAGA & POLETO, 2020; ABUD & SILVA, 2019; BEZERRA & RAGAUSKAS, 2016; PEREIRA *et al.*, 2015; SAMBUSITI *et al.*, 2015).

Apesar de todos os pontos favoráveis à sua utilização como insumo, a lignocelulose possui uma estrutura altamente recalcitrante formada pela complexa associação entre seus três principais componentes poliméricos (celulose, hemicelulose e lignina) (Figura 2) (WANG *et al.*, 2019a; XU *et al.*, 2019; ANDLAR *et al.*, 2018). Esse constitui o principal desafio para o processamento da mesma nas biorrefinarias, que dificulta alcançar uma produção dos derivados em larga escala de forma eficiente e rentável (GOMES *et al.*, 2021; van EERDE *et al.*, 2020; ROSALES-CALDERON & ARANTES, 2019).

Figura 2 – Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica

Fonte: figura adaptada de HASANOV *et al.*, 2020.

A proporção entre os polímeros que compõem a lignocelulose é dependente da fonte da matéria-prima e do estágio de crescimento da planta, podendo variar até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (KHAIRE *et al.*, 2021; LI & ZHENG, 2017; MÉNDEZ

ARIAS *et al.*, 2016). No caso da biomassa do bagaço da cana-de-açúcar, observa-se, geralmente, uma composição de 40-50% celulose, 25-35% hemicelulose e 15-20% lignina, além de um pequeno percentual de outros componentes (cinzas e extrativos) (ALOKIKA *et al.*, 2021; BORIN *et al.*, 2017, 2015; SZCZERBOWSKI *et al.*, 2014). Dentre esses, apenas as frações de celulose e hemicelulose são compostas por polissacarídeos e podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção do etanol por fermentação (YOO *et al.*, 2020; MATSUSHIKA *et al.*, 2009). Contudo, é importante salientar que a valorização da lignina como alternativa renovável para a obtenção de produtos químicos de alto valor agregado (por exemplo: vanilina, adesivos fenol-formaldeído, biopolímeros, entre outros) poderia aumentar significativamente a competitividade econômica das biorrefinarias (YOO *et al.*, 2020; de PAULA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019a; SHIKINAKA *et al.*, 2018). As características químicas e estruturais desses três componentes poliméricos estão descritas mais detalhadamente a seguir.

1.3.1 Celulose

A celulose é o componente majoritário da lignocelulose, sendo assim o polissacarídeo mais abundante da Terra (STRAKOWSKA *et al.*, 2014). Quimicamente, consiste em um homopolímero linear constituído por 7000-15000 unidades de D-glicose unidas umas às outras através de ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ e interações de hidrogênio intramoleculares (Figura 3) (de PAULA *et al.*, 2019; STRAKOWSKA *et al.*, 2014; MOOD *et al.*, 2013; HORN *et al.*, 2012). Os monômeros de glicose consecutivos encontram-se rotacionados entre si por um ângulo de 180° , portanto a celobiose (dissacarídeo) é a menor unidade repetitiva da molécula de celulose (SHARMA *et al.*, 2020; HOSSEINI KOUAIE *et al.*, 2019; STRAKOWSKA *et al.*, 2014; HORN *et al.*, 2012). Na natureza, cerca de 30-36 cadeias celulósicas agregadas lateralmente através de interações de hidrogênio intermoleculares e forças de van der Waals formam microfibrilas altamente cristalinas e insolúveis, podendo apresentar algumas regiões amorfas em sua estrutura (SHARMA *et al.*, 2020; HOSSEINI KOUAIE *et al.*, 2019; SEGATO *et al.*, 2017; STRAKOWSKA *et al.*, 2014; HORN *et al.*, 2012; ARANTES & SADDLER, 2010). Essas características estruturais conferem à celulose uma elevada resistência a ataques químicos e biológicos, tornando-a o polissacarídeo de mais difícil desconstrução da parede celular vegetal (ALI *et al.*, 2020; de PAULA *et al.*, 2019; HOSSEINI KOUAIE *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2019; LI & ZHENG, 2017; SEGATO *et al.*, 2017).

Figura 3 – Estrutura química da celulose

Fonte: figura adaptada de LEE *et al.*, 2014.

1.3.2 Hemicelulose

A hemicelulose compreende uma série de heteropolissacarídeos ramificados com graus de polimerização variando entre 200-700 e que podem apresentar em sua composição hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose), pentoses (D-xilose, L-arabinose), ácidos urônicos (ácido D-glucurônico, ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ácido D-galacturônico) e ácido acético (Figura 4) (ABRAHAM *et al.*, 2020; MOOD *et al.*, 2013; CANILHA *et al.*, 2012). De maneira geral, os polímeros de hemicelulose podem ser classificados como xilanas (esqueleto de $\beta(1,4)$ -D-xilopirranose), mananas (esqueleto de $\beta(1,4)$ -D-manopirranose), xiloglucanas (esqueleto de $\beta(1,4)$ -D-glicopirranose) ou β -glucanas (cadeia linear formada por ambas unidades de $\beta(1,3)$ - e $\beta(1,4)$ -D-glicopirranoses), os quais podem apresentar diferentes cadeias laterais (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; de PAULA *et al.*, 2019). Dentre esses, as xilanas se destacam pela maior abundância e, conforme mencionado acima, são constituídas por um esqueleto central de monômeros de D-xilose interconectados através de ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$, sendo o mesmo frequentemente acetilado e podendo conter principalmente ramificações de L-arabinose e ácido D-glucurônico ligadas às unidades de xilopirranose em vários níveis (BERNARDI *et al.*, 2021a; MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; ABRAHAM *et al.*, 2020; CHANG *et al.*, 2017; CORTEZ *et al.*, 2010).

Ao contrário da celulose, a fração hemicelulósica é estruturalmente amorfa, sendo, portanto, mais susceptível à degradação (ABRAHAM *et al.*, 2020; CANILHA *et al.*, 2012). Na

parede celular vegetal, a hemicelulose está ligada de forma não-covalente às microfibrilas celulósicas, revestindo-as e atuando como uma barreira a agentes químicos e biológicos (ABRAHAM *et al.*, 2020; ALI *et al.*, 2020; ARANTES & SADDLER, 2010).

Figura 4 – Estruturas químicas de diferentes tipos de hemiceluloses

Fonte: CORTEZ *et al.*, 2010.

1.3.3 Lignina

A lignina é o biopolímero aromático presente em maior abundância na natureza, existindo como uma barreira física de proteção contra microrganismos ao mesmo tempo em que promove força e hidrofobicidade à parede celular vegetal (ALOKIKA *et al.*, 2021; YOO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2018). Conforme ilustrado na Figura 5, sua estrutura consiste, basicamente, em repetições de três principais subunidades – guaiacil,iringil e *p*-hidroxifenil – derivadas da polimerização dos respectivos monolignóis – álcoois coniferílico, sináplico e *p*-cumarílico – e cujas proporções variam entre as espécies vegetais (ALOKIKA *et al.*, 2021; ANTOLINI, 2021; YOO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2018). Na parede celular, a lignina encontra-se associada à

hemicelulose através de ligações do tipo éster com cadeias laterais dos heteropolissacarídeos, envolvendo a fração holocelulósica (ALOKIKA *et al.*, 2021; ALI *et al.*, 2020). Suas propriedades químicas e estruturais fazem dela um fator-chave responsável pela elevada recalcitrância da lignocelulose e, por consequência, um dos principais obstáculos para uma recuperação eficiente dos açúcares simples que compõem a biomassa (YOO *et al.*, 2020; de PAULA *et al.*, 2019; CANILHA *et al.*, 2012).

Figura 5 – Estrutura química da lignina

Fonte: LEE *et al.*, 2014.

1.4 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Devido à complexidade estrutural da lignocelulose, seu processamento nas biorrefinarias envolve, inicialmente, um pré-tratamento (podendo ser físico, químico, físico-químico, biológico ou uma combinação entre eles) que visa modificar a estrutura da biomassa para tornar seus polissacarídeos mais acessíveis. Essa etapa inicial, por si só, corresponde a cerca de 50% dos custos totais do processo de fabricação do etanol, devido à grande quantidade

de energia e reagentes químicos despendida durante a sua realização (ZHANG *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2020; ABUD & SILVA, 2019; CHANDEL *et al.*, 2019; BRIENZO *et al.*, 2017; SINDHU *et al.*, 2016). O passo seguinte consiste na hidrólise (sacarificação) do material pré-tratado, na qual celulose e hemicelulose são convertidas a açúcares monoméricos, principalmente glicose e xilose. Esses últimos serão processados a etanol, mediante ação microbiana, durante a etapa de fermentação (ALOKIKA *et al.*, 2021; ALI *et al.*, 2020; BERNARDES *et al.*, 2019; PAULOVA *et al.*, 2015).

Mesmo que a despolimerização da celulose e hemicelulose possa ser realizada quimicamente, a hidrólise enzimática constitui uma abordagem muito mais ecológica e sustentável e, portanto, é o principal método utilizado nas biorrefinarias. Comparada à hidrólise ácida, a sacarificação enzimática requer condições reacionais mais suaves, envolve um menor gasto energético, gera menores quantidades de inibidores da fermentação (por exemplo: ácidos orgânicos, furfurais e hidroximetilfurfurais (HMF)), e, ao mesmo tempo, resulta em maiores rendimentos (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; ALI *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2020; BEN TAHER *et al.*, 2017; CHEN & FU, 2016; MOYSÉS *et al.*, 2016; PANDIYAN *et al.*, 2014; SAYED JAMALUDIN *et al.*, 2013; SHIN *et al.*, 2011). Apesar de todos os avanços obtidos na área durante os últimos anos, a eficiência econômica da hidrólise enzimática ainda é afetada por alguns fatores, como a grande quantidade de enzimas requerida para o processo e os elevados custos das mesmas. Com valores estimados para os coquetéis enzimáticos variando de \$0,10 a \$0,40 por galão de etanol, a etapa de sacarificação representa mais de 15% dos custos envolvidos no processo, sendo um dos maiores entraves na produção desse biocombustível de segunda geração (NOVACANA, 2016; ALI *et al.*, 2020; VU *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019a; BORIN *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2017; LI & ZHENG, 2017; CHEN & FU, 2016; LE COSTAOUËC *et al.*, 2013; VÁRNAI *et al.*, 2013).

1.4.1 Enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes)

O processo enzimático de sacarificação da celulose e hemicelulose a açúcares fermentescíveis é dependente da ação sinérgica de um complexo repertório de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes, *carbohydrate-active enzymes*) (Figura 6) (CHETTRI *et al.*, 2020). As CAZymes são catalogadas no banco de dados CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes database*, disponível em: www.cazy.org), onde são agrupadas em cinco diferentes classes – Glicosil hidrolases (GH), Polissacarídeo liases (PL), Carboidrato esterases (CE), Atividades auxiliares (AA) e Glicosil transferases (GT) – e essas, por sua vez, são subdivididas em famílias

(existindo, atualmente, 168) (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; BORIN *et al.*, 2017; CRAGG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2013).

Aproximadamente 7% dessas enzimas apresentam módulos de ligação a carboidratos (CBM, *carbohydrate-binding modules*) em adição aos seus módulos catalíticos, os quais são responsáveis, principalmente, pelo reconhecimento e ligação específicos a um dado substrato (ZHAO *et al.*, 2013; GUILLÉN *et al.*, 2010). Tal classificação é baseada na similaridade das estruturas primárias, conservação das estruturas secundárias e terciárias, arquiteturas estereoquímicas e, ainda, em seus mecanismos catalíticos (CHAMPREDA *et al.*, 2019; BORIN *et al.*, 2017). Todas essas classes abrangem enzimas atuantes na degradação de glicanos, com exceção das GTs e da família 10 das CEs (BORIN *et al.*, 2017). As GHs promovem a quebra das ligações glicosídicas entre carboidratos; as CEs catalisam a des-O-acilação ou des-N-acilação de glicoconjugados; as PLs degradam glicosaminoglicanos e pectina; e as AAs atuam juntamente com as GHs através de um mecanismo de oxidorredução (CRAGG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2013).

Dentre essas, as glicosil hidrolases estão entre os mais eficientes biocatalisadores disponíveis, sendo capazes de acelerar a quebra das estáveis ligações glicosídicas por um fator de 10^{17} comparado à autohidrólise espontânea (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021). Essa catálise pode ocorrer com inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico. Esses dois mecanismos diferem entre si pois, no primeiro caso, ocorre o deslocamento direto do grupo de saída pela água; no segundo, por sua vez, ocorre um deslocamento duplo envolvendo a formação de um intermediário covalente glicosil-enzima (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; SEGATO *et al.*, 2017; MHLONGO *et al.*, 2014; McCARTER & WITHERS, 1994). Apesar das diferenças, ambos os mecanismos catalíticos são mediados por um par de ácidos carboxílicos presentes no sítio ativo da enzima, provenientes de resíduos de glutamato ou aspartato (MHLONGO *et al.*, 2014; McCARTER & WITHERS, 1994). De acordo com a Comissão de Enzimas (EC, *Enzyme Commission*), que classifica as enzimas baseada nas reações que catalisam, as GHs estão compreendidas entre os números EC 3.2.1.1 e 3.2.1.212, o que demonstra a alta diversidade de glicosil hidrolases conhecidas (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021).

Figura 6 – Esquema representativo da desconstrução da lignocelulose mediante a ação de CAZymes

AF: α -L-arabinofuranosidase; AFC: α -fucosidase; AFE: Ácido ferúlico esterase; AG: α -D-glucuronidase; AGAL: α -galactosidase; AX: α -xilosidase; BG: β -glicosidase; BGAL: β -galactosidase; BX: β -xilosidase; CBH: celobiohidrolase; CBM1: módulo de ligação a celulose; EG: Endo-1,4- β -glucanase; EM: Endo-1,4- β -mananase; EX: Endo-1,4- β -xilanase; XG: Xiloglucanase. Fonte: figura adaptada de GLASS *et al.*, 2013.

O modelo clássico para a desconstrução da celulose envolve a ação de três principais glicosil hidrolases: endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas presentes no interior do polímero de celulose; celobiohidrolases/exoglucanases (EC 3.2.1.91), que atuam sobre as extremidades redutora e não-redutora da cadeia, liberando moléculas de celobiose; e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que catalisam a clivagem das celobioses a monômeros de D-glicose (BERNARDI *et al.*, 2018; SEGATO *et al.*, 2017; HORN *et al.*, 2012).

Além dessas, enzimas com atividades auxiliares pertencentes às famílias AA9 e AA10, denominadas mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*, EC 1.14.99.53-56), auxiliam na degradação da celulose através de um mecanismo oxidativo (RANI SINGHANIA *et al.*, 2021; VELASCO *et al.*, 2021; BERNARDI *et al.*, 2021b; SEGATO *et al.*, 2017; MOROZ *et al.*, 2015). Soma-se ainda a ação de expansinas e de outras enzimas similares, como a swolenina, que promovem o relaxamento das fibras celulósicas mediante ruptura não-hidrolítica de ligações não-covalentes entre as cadeias,

potencializando o desempenho hidrolítico das celulases (Figura 7) (ZHANG *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2019a).

Figura 7 – Representação do processo enzimático de despolimerização da celulose

Fonte: figura adaptada de GLASGOW *et al.*, 2021.

Na despolimerização da hemicelulose, é requerida uma gama mais diversificada de CAZymes, uma vez que essa fração da biomassa abrange um grupo de polissacarídeos de composição heterogênea (BERNARDI *et al.*, 2021a; CHAMPREDA *et al.*, 2019; CHANG *et al.*, 2017; GLASS *et al.*, 2013). No caso da xilana, por exemplo, os principais biocatalisadores envolvidos são as endo-1,4-β-xilanases (EC 3.2.1.8) e β-xilosidases (EC 3.2.1.37), que catalisam a hidrólise da cadeia homopolimérica principal a monômeros de D-xilose, atuando geralmente em conjunto com α-L-arabinofuranosídes (EC 3.2.1.55), α-D-glucuronídes (EC 3.2.1.139), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) e ácido ferúlico esterases (EC 3.1.1.73), que catalisam a remoção dos substituintes da molécula (BERNARDI *et al.*, 2021a; MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021) (Figura 8). Mais especificamente, α-L-arabinofuranosídes e α-D-glucuronídes são glicosil hidrolases que atuam na clivagem de ligações glicosídicas entre unidades de D-xilose da cadeia principal e ramificações de L-arabinose e ácido-D-glucurônico, respectivamente (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; GENG *et al.*, 2019; ROSA *et al.*, 2013).

Similarmente, as acetil xilana esterases, que são pertencentes à classe das carboidrato esterases, catalisam a hidrólise de ligações éster entre resíduos de D-xilose e seus substituintes acetil (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2020). Finalmente, as ácido ferúlico esterases, pertencentes exclusivamente à família 1 de CEs, catalisam a remoção de resíduos de ácido ferúlico que se encontram esterificados a resíduos de L-arabinose nas cadeias laterais da xilana (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; HOLCK *et al.*, 2019).

Figura 8 – Representação do processo enzimático de despolimerização da xilana

Fonte: figura adaptada de MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021.

1.4.1.1 Celulases: endoglucanases e celobiohidrolases

Conforme já mencionado, o mecanismo clássico de degradação da celulose envolve a ação de um complexo celulolítico formado por endoglucanases, celobiohidrolases e β-glicosidases atuando sinergicamente entre si (AKRAM *et al.*, 2018, MOROZ *et al.*, 2015). As endo-1,4-β-glucanases são as enzimas-chave desse processo, responsáveis por catalisar o ataque inicial à celulose, no qual ocorre a hidrólise randômica de ligações glicosídicas β(1→4) presentes nas regiões amorfas da cadeia, resultando na liberação de oligossacarídeos e novas cadeias com diferentes comprimentos (ZHOU *et al.*, 2021; AKRAM *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2011a).

Diversos organismos são produtores de endoglucanases, como arqueas, bactérias, plantas e fungos, mas esses últimos constituem as principais fontes de celulases para aplicações industriais (ZHOU *et al.*, 2021; RUNGRATTANAKASIN *et al.*, 2018). De acordo com o banco de dados CAZy, as endo-1,4- β -glucanases estão distribuídas em 13 famílias de glicosil hidrolases (GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH10, GH12, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74 e GH124), das quais GH5, GH6, GH7, GH9, GH12, GH45, GH48 e GH74 são produzidas por fungos (ZHOU *et al.*, 2021; AKRAM *et al.*, 2018; HUA *et al.*, 2018; SEGATO *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015). Dentre essas, enzimas celulolíticas da família GH7 (endoglucanases e celobiohidrolases) estão entre as mais prevalentes nos secretomas de fungos degradadores de biomassa (AICH & DATTA, 2020).

Endoglucanases GH7 se destacam pela habilidade de atuar sobre uma ampla gama de substratos, além da celulose, incluindo β -glucana, liquenana, laminarina e até mesmo xilana (AICH & DATTA, 2020; BORISOVA *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2015). Devido a essa versatilidade catalítica, as mesmas constituem alvos atrativos para o uso em inúmeras aplicações industriais, que vão desde a sacarificação da biomassa vegetal para gerar glicose (que, por sua vez, é precursor molecular de muitos outros bioprodutos, como etanol, propanol, ácido lático, ácido succínico, acetona, entre outros), até processos como o biopolimento e biolapidação em indústrias têxteis; a extração, clarificação e redução da viscosidade de sucos de frutas em indústrias alimentícias; e a utilização como aditivos para aumentar o valor nutricional da dieta de animais (de PAULA *et al.*, 2019; AKRAM *et al.*, 2018; KARNAOURI *et al.*, 2017; KHALILI GHADIKOLAEI *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2015; BHAT, 2000).

As celobiohidrolases atuam em sinergia com as endoglucanases, preferencialmente sobre regiões cristalinas da celulose (BARAMEE *et al.*, 2017; BRADY *et al.*, 2015). São componentes essenciais dos coquetéis enzimáticos aplicados em processos industriais que envolvem a hidrólise de celulose (por exemplo, na produção de biocombustíveis) e, juntamente com outras carboidrases, proteases e lipases representam mais de 70% do mercado de enzimas (dos SANTOS *et al.*, 2020; DOTSENKO *et al.*, 2020; REDDY DODDA *et al.*, 2016; BRADY *et al.*, 2015).

Essas enzimas atuam processivamente na remoção de moléculas de celobiose a partir das extremidades das cadeias celulósicas, sendo portanto indispensáveis para uma despolimerização completa e eficiente desse polímero (VERMAAS *et al.*, 2019; CHRISTENSEN *et al.*, 2018; DU *et al.*, 2018; BARAMEE *et al.*, 2017; BRADY *et al.*, 2015). A processividade é definida como a capacidade de uma enzima de catalisar reações

consecutivas sem se desligar do substrato (BREYER & MATTHEWS, 2001), sendo as celobiohidrolases um exemplo bem conhecido, pois são capazes de gerar, sequencialmente, múltiplas moléculas de celobiose enquanto permanecem associadas ao substrato celulósico (VERMAAS *et al.*, 2019; CHRISTENSEN *et al.*, 2018).

O banco de dados CAZy classifica as celobiohidrolases em quatro famílias de glicosil hidrolases (GH6, GH7, GH9 e GH48), sendo dois tipos dessas enzimas predominantemente produzidos por fungos: celobiohidrolases GH6 (Cel6A ou CBH II) e GH7 (Cel7A ou CBH I), que se distinguem entre si pelo mecanismo de catálise e pela extremidade da cadeia sobre a qual atuam (dos SANTOS *et al.*, 2020; VERMAAS *et al.*, 2019; CHRISTENSEN *et al.*, 2018; KADOWAKI *et al.*, 2018; BARAMÉE *et al.*, 2017; GOEDEGEBUUR *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2018; REDDY DODDA *et al.*, 2016; MOROZ *et al.*, 2015; LE COSTAOUËC *et al.*, 2013).

As GH6 catalisam a clivagem de ligações glicosídicas presentes nas extremidades não-redutoras das cadeias através de um mecanismo de etapa única que resulta na inversão da configuração do carbono anomérico (VERMAAS *et al.*, 2019; CHRISTENSEN *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2018). Atualmente, a maioria das celobiohidrolases descritas na literatura são membros da família GH7, enquanto uma minoria de trabalhos é direcionada à caracterização de celobiohidrolases GH6 (CHRISTENSEN *et al.*, 2018); contudo, a ação sinérgica entre ambas é fundamental para uma eficiente despolimerização da celulose.

1.4.1.2 Hemicelulases: xilanases

A despolimerização enzimática dos diferentes tipos de hemicelulose (xilana, xiloglucana, β -glucana, entre outros) requer a ação coletiva e sinérgica de um amplo repertório de glicosil hidrolases e carboidrato esterases (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; AN *et al.*, 2015). Particularmente no caso da xilana, a desconstrução da cadeia principal a monômeros de D-xilose pode ser alcançada mediante a catálise por endo-1,4- β -xilanases e β -xilosidases (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021). As xilanases desempenham um papel fundamental nesse processo, uma vez que promovem o ataque inicial às ligações glicosídicas presentes no interior desse polímero, convertendo-o em xilooligossacarídeos (XOs) com diferentes graus de polimerização (CHEN *et al.*, 2019a; HAN *et al.*, 2019; HAQ & AKRAM, 2019; YANG *et al.*, 2019; EVANGELISTA *et al.*, 2018; AN *et al.*, 2015).

Os XOs são produtos de alto valor agregado que podem ser potencialmente explorados como prebióticos ou, ainda, convertidos a xilose pelas β -xilosidases; esse açúcar, por sua vez, pode ser utilizado na produção de etanol 2G, xilitol, ácido lático, entre outros bioprodutos

(MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; POLETTTO *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2019; EVANGELISTA *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018a; AN *et al.*, 2015; TURNER *et al.*, 2015). Além disso, xilanases são biocatalisadores industrialmente relevantes para outros processos, incluindo o branqueamento de polpa de papel, a clarificação de sucos de frutas, a panificação, a finalização de cervejas, o tratamento de resíduos industriais e a degomagem de fibras têxteis (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; BERNARDI *et al.*, 2021a; CHEN *et al.*, 2019a; de AMO *et al.*, 2019; EVANGELISTA *et al.*, 2018; KUMAR & SHUKLA, 2018; AN *et al.*, 2015). Todas essas possibilidades de aplicações biotecnológicas justificam a elevada quantidade de estudos sobre xilanases presentes na literatura e o crescente interesse por essa enzima.

Xilanases são produzidas por muitos microrganismos, incluindo bactérias, actinomicetos, protozoários e fungos (CHEN *et al.*, 2019a; KUMAR & SHUKLA, 2018; AN *et al.*, 2015). Baseado no banco de dados CAZy, as xilanases possuem representantes nas famílias GH3, GH5, GH7, GH8, GH9, GH10, GH11, GH12, GH16, GH26, GH30, GH43, GH44, GH51, GH62, GH98 e GH141; contudo, a grande maioria é representada pelas famílias GH10 e GH11 (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; JOSHI *et al.*, 2020; LIEW *et al.*, 2019; MALGAS & PLETSCHE, 2019). Os membros das famílias GH10 e GH11 se assemelham por exibirem o mesmo mecanismo catalítico – de retenção – mas são distintos em muitos outros aspectos (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2016).

Xilanases GH11, por exemplo, geralmente apresentam eficiências catalíticas superiores, além de valores de pI mais elevados e pesos moleculares menores que 30 kDa. Por outro lado, foi reportado que xilanases GH10 exibiram melhores desempenhos quando associadas a celulases durante a degradação de biomassas; somado a isso, essas enzimas costumam exibir maiores termoestabilidade e versatilidade catalítica (ou seja, possuem a habilidade de atuar em uma maior variedade de substratos ou, mais especificamente, em xilanas com diferentes graus e tipos de substituição), sendo, portanto, alvos muito interessantes para propósitos industriais (MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2021; JOSHI *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019b; YANG *et al.*, 2019; HU & SADDLER, 2018; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2016; van GOOL *et al.*, 2013).

1.4.2 Bioprospecção de novas enzimas hidrolíticas

A elevada recalcitrância da biomassa lignocelulósica demanda o uso de grandes quantidades de enzimas para convertê-la eficientemente a açúcares fermentáveis (van EERDE *et al.*, 2020; CUNHA *et al.*, 2017; LI & ZHENG, 2017; LE COSTAOUËC *et al.*, 2013).

Atualmente, essas enzimas são provenientes de uma variedade limitada de fungos, sendo as cepas mutantes (especialmente a variante RUT-C30) de *Trichoderma reesei* (anamorfo de *Hypocrea jecorina*) os principais organismos utilizados nessa produção (SONODA *et al.*, 2019; BORIN *et al.*, 2017; SHIBATA *et al.*, 2017; MOROZ *et al.*, 2015). Essa espécie de fungo filamentoso mesofílico tem sido um organismo modelo para a pesquisa básica e aplicada por mais de 50 anos devido à sua capacidade de secretar altos títulos de celulases, em níveis que podem chegar a 100 g L⁻¹ (SONODA *et al.*, 2019; WAHAB *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019b; BORISOVA *et al.*, 2018; SHIBATA *et al.*, 2017; MOROZ *et al.*, 2015; HASUNUMA *et al.*, 2013). Contudo, suas celulases e hemicelulases não são absolutamente ótimas em termos de atividade específica e termoestabilidade (GOEDEGEBUUR *et al.*, 2017; MOROZ *et al.*, 2015). Além disso, os níveis de produção de β -glicosidases são notavelmente mais baixos em comparação aos de outros fungos, tais como *Aspergillus sp.*, assim como a tolerância dessas enzimas à inibição por glicose (OGUNYEWU *et al.*, 2020; SHIBATA *et al.*, 2017; FANG & XIA, 2015; HASUNUMA *et al.*, 2013). Similarmente, suas celobiohidrolases são altamente sensíveis à inibição por celobiose, o que torna necessário utilizar elevadas quantidades dessas enzimas nos coquetéis celulolíticos (SHIBATA *et al.*, 2017; van den BRINK & de VRIES, 2011).

Apesar dos progressos obtidos nos últimos anos em termos de eficiência dos pré-tratamentos e produção de enzimas, o preço dos coquetéis enzimáticos ainda representa um dos principais entraves para a implementação de biorrefinarias lignocelulósicas em larga escala e de forma economicamente viável (GOMES *et al.*, 2021; van EERDE *et al.*, 2020; BORIN *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2017; LI & ZHENG, 2017; LE COSTAOUËC *et al.*, 2013; VÁRNAI *et al.*, 2013).

Diferentes estratégias têm sido exploradas visando reduzir os custos associados à sacarificação enzimática da lignocelulose, incluindo: a engenharia genética de enzimas nativas já caracterizadas, visando torná-las mais robustas para aplicações biotecnológicas (SIDAR *et al.*, 2020; AKBARZADEH *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018a; SINGH *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2016; MOROZ *et al.*, 2015); a modificação genética de microrganismos degradadores de lignocelulose, principalmente com o intuito de aumentar os níveis de produção das enzimas PCWD (*Plant Cell Wall Degrading*) (GABRIEL *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2017); o desenvolvimento de microrganismos fermentativos capazes de degradar a biomassa, conhecido como bioprocessamento consolidado (CBP, *consolidated bioprocessing*) (LIU *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020); a imobilização de enzimas, que possibilita o reuso das mesmas e, ainda, facilita a recuperação dos produtos a partir da mistura reacional (GOMES *et al.*, 2021; KUMAR

et al., 2018a; VAZQUEZ-ORTEGA *et al.*, 2018; KARIM *et al.*, 2014); e a bioprospecção de enzimas com propriedades industriais superiores (PASIN *et al.*, 2020; AKBARZADEH *et al.*, 2018; EVANGELISTA *et al.*, 2018; MOROZ *et al.*, 2015).

A bioprospecção de enzimas possibilita a identificação de biocatalisadores com características industriais mais desejáveis, como atividades específicas mais elevadas, maior termoestabilidade e tolerância a inibidores, o que contribui diretamente para a otimização dos coquetéis enzimáticos, maximizando os rendimentos de produto e reduzindo os custos do processo (WAHAB *et al.*, 2019).

Na natureza, a degradação da biomassa vegetal é conduzida por uma extensa comunidade de microrganismos capazes de secretar arsenais de CAZymes que atuam em sinergia e com complementariedade, desempenhando assim um papel essencial na reciclagem do carbono (OGUNYEWU *et al.*, 2020; BERNARDES *et al.*, 2019; WAHAB *et al.*, 2019; BORIN *et al.*, 2017; CRAGG *et al.*, 2015; van den BRINK & de VRIES, 2011; ARO *et al.*, 2005). Dentre esses, os fungos filamentosos se destacam como os mais eficientes degradadores devido à secreção de misturas enzimáticas completas (celulases, hemicelulases, pectinases e ligninases) em grandes quantidades e altamente específicas para os substratos com que se deparam, e pelo seu modo de crescimento hifal, que permite uma colonização mais eficiente do substrato (MIAO *et al.*, 2018, 2015; CULLETON *et al.*, 2013; COUTINHO *et al.*, 2009).

Uma vez que a maioria dos processos industriais são operados em altas temperaturas, fungos filamentosos termofílicos e termotolerantes, capazes de produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas consideravelmente termoestáveis e termoativas, são de particular interesse para a indústria (SAROJ *et al.*, 2018). Dentre os inúmeros benefícios de se realizar a hidrólise da celulose e hemicelulose em temperaturas mais elevadas, pode-se citar: o aumento e a diminuição, respectivamente, da solubilidade e da viscosidade dos substratos; a redução no risco de contaminação bacteriana durante o processo e, ainda, a possibilidade de se utilizar as enzimas diretamente após pré-tratamentos hidrotérmicos e de explosão a vapor, sem a necessidade de arrefecimento, o que economiza tempo e energia (AICH & DATTA, 2020; NAKABAYASHI *et al.*, 2019; SHIBATA *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015; MOROZ *et al.*, 2015; dos SANTOS *et al.*, 2015; KARNAOURI *et al.*, 2014). A utilização de enzimas com maiores estabilidades térmicas levaria à retenção de suas atividades catalíticas por maiores períodos de tempo mesmo em temperaturas mais extremas, diminuindo a quantidade de enzimas necessárias para a sacarificação (AICH & DATTA, 2020; SHIBATA *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015; MOROZ *et al.*, 2015; KARNAOURI *et al.*, 2014).

O gênero *Aspergillus sp.* compreende microrganismos que naturalmente degradam a biomassa lignocelulósica através da secreção de um complexo repertório de CAZymes, caracterizando seu estilo de vida saprofítico (RUBIO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2013). O sequenciamento do genoma de algumas espécies de *Aspergillus* revelou um maior número de genes codificantes de glicosil hidrolases em comparação ao fungo padrão *T. reesei*: por exemplo, foram identificados 263 e 247 genes codificantes de GHs nos genomas de *A. fumigatus* e *A. nidulans*, respectivamente, frente a 200 genes no genoma de *T. reesei* (ADAV *et al.*, 2015; GALAGAN *et al.*, 2005; MACHIDA *et al.*, 2005; NIERMAN *et al.*, 2005).

Com relação ao número de celulases (endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases), foram reportados 29, 28 e 24 genes no genoma de *A. oryzae*, *A. fumigatus* e *A. niger*, respectivamente, enquanto somente 18 genes estão presentes no genoma de *T. reesei*. Ainda relacionado à degradação de celulose, *T. reesei* possui um menor repertório de enzimas oxidativas (4 LPMOs AA9 e nenhuma celobiose desidrogenase) do que *A. oryzae* (8 e 3), *A. fumigatus* (7 e 2) e *A. niger* (7 e 1) (SEGATO *et al.*, 2014). Similarmente, *T. reesei* exibe um menor número de hemicelulases (16 genes) do que *A. nidulans* (35), *A. fumigatus* (36) e *A. oryzae* (40) (ADAV *et al.*, 2015). Portanto, *Aspergillus sp.* representa uma família de fungos filamentosos ascomicetos com ampla diversidade de enzimas lignocelulolíticas que podem ser utilizadas para aplicações industriais (ADAV *et al.*, 2015; ROKAS *et al.*, 2012). *A. niger* e *A. oryzae* tem sido as espécies mais exploradas industrialmente para a produção de produtos farmacêuticos, ingredientes culinários, ácidos orgânicos e enzimas (sendo essas direcionadas às mais diversas aplicações biotecnológicas) (DALY *et al.*, 2017; BENOIT-GELBER *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2011a; PEL *et al.*, 2007; GALAGAN *et al.*, 2005); contudo, outras espécies, como o *A. fumigatus*, também têm ganhado relevância nos últimos anos pelos seus potenciais biotecnológicos.

Apesar de patogênico, o *A. fumigatus* também se destaca por ser um saprófito termotolerante capaz de produzir complexos enzimáticos muito ativos e estáveis para degradar a parede celular vegetal (de GOUVÊA *et al.*, 2018; ADAV *et al.*, 2015; dos SANTOS *et al.*, 2015; MOROZ *et al.*, 2015; KWON-CHUNG & SUGUI, 2013; LIU *et al.*, 2013, 2011a). Embora seu crescimento ótimo seja atingido a 37 °C e em pH variando de 3,7 a 7,6, esse fungo pode suportar temperaturas de até 65 °C, bem como condições mais extremas de pH (2,1 a 8,8) (KWON-CHUNG & SUGUI, 2013). Inclusive, muitas glicosil hidrolases desse fungo, cujas propriedades já foram caracterizadas, apresentaram termoestabilidades consideráveis, como as endoglucanases Egl2 e Egl3 (LIU *et al.*, 2011b), a β -glicosidase Bgl3 (LIU *et al.*, 2012) e a xilanase Af-XYNA (CHANG *et al.*, 2017). Todos esses pontos evidenciam o potencial do *A.*

fumigatus como uma fonte promissora de enzimas de interesse industrial, as quais poderão ser aplicadas em uma ampla variedade de processos, incluindo na confecção de coquetéis enzimáticos eficientes para a conversão do material lignocelulósico a açúcares fermentáveis, visando à obtenção de etanol e outros bioprodutos.

A eficiência de uma mistura enzimática é altamente dependente da composição e estrutura da biomassa sobre a qual estão atuando (que, por sua vez, variam entre as diferentes fontes de lignocelulose e com a tecnologia de pré-tratamento utilizada), indicando a necessidade de se customizar os coquetéis para cada matéria-prima individualmente (ADSUL *et al.*, 2020; ØSTBY *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2018; HORTA *et al.*, 2014; LAMBERTZ *et al.*, 2014). Uma abordagem estratégica a ser considerada durante o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos customizados é o cultivo dos microrganismos na presença do material lignocelulósico de interesse, que permite selecionar as enzimas que são ideais especificamente para a sua degradação (LOPES *et al.*, 2018; HORTA *et al.*, 2014). Um dos mecanismos primários de adaptação das células a uma dada condição é a alteração dos níveis de transcrição, que pode levar à produção de proteínas especializadas (LOPES *et al.*, 2018; HORTA *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a bioprospecção de CAZymes de *A. fumigatus* Af293 foi realizada por nosso grupo de pesquisa através das análises do transcriptoma e secretoma desse fungo cultivado na presença de bagaço de cana-de-açúcar explodido (SEB) como fonte de carbono (de GOUVÊA *et al.*, 2018). Os dados obtidos revelaram 144 genes codificantes de CAZymes com níveis de transcrição aumentados na presença dessa biomassa, sendo 50 dessas enzimas também presentes no secretoma e relacionadas principalmente à degradação de holocelulose (endoglucanases, celobiohidrolases, β -glicosidases, endoxilanases, xilosidases, LPMOs, swollenina, arabinofuranosidases, entre outras). A partir desses resultados, e considerando a importância dessas enzimas para a degradação da celulose e hemicelulose, foram selecionadas para o presente estudo uma endo-1,4- β -glucanase GH7 (Afu6g01800, nomeada Af-EGL7), uma celobiohidrolase GH6 (Afu3g01910, nomeada Af-Cel6A) e uma endo-1,4- β -xilanase GH10 (Afu6g13610, nomeada Af-XYLA).

1.5 SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Apesar dos fungos filamentosos sobressaírem frente a outros microrganismos com relação às quantidades de CAZymes extracelulares produzidas, seus níveis de expressão nem sempre são suficientemente altos para atender aos requisitos industriais (de AMO *et al.*, 2019).

Além disso, os mesmos são difíceis de cultivar, requerem longos períodos de fermentação, e, ainda, a purificação das enzimas de interesse pode ser complexa devido à presença de isoenzimas ou outras proteínas com características similares (por exemplo: peso molecular, carga, ponto isoelétrico) (ALI *et al.*, 2020; de AMO *et al.*, 2019; LAMBERTZ *et al.*, 2014).

A aplicação industrial de enzimas com um bom custo/benefício pode ser obtida pela produção das mesmas em larga escala usando substratos simples e baratos. Nesse sentido, uma estratégia eficiente consiste na clonagem e expressão dessas enzimas em sistemas heterólogos (de AMO *et al.*, 2019). O gene exógeno pode ser expresso em hospedeiros procariotos ou eucariotos, cada qual apresentando vantagens e desvantagens inerentes às suas maquinarias celulares que podem impactar consideravelmente nas propriedades da enzima recombinante de interesse (ALI *et al.*, 2020; ROSANO & CECCARELLI, 2014; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Os próximos tópicos descrevem de uma maneira mais detalhada os prós e os contras associados a dois sistemas de expressão muito utilizados: *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*.

1.5.1 *Escherichia coli*: um clássico hospedeiro procarioto

Desde o início da década de 80, a bactéria *Escherichia coli* tem sido o sistema de expressão procariótico mais utilizado por permitir a expressão de uma grande quantidade de proteínas de maneira rápida e a um baixo custo (ALI *et al.*, 2020; MARTÍNEZ-ESPINOSA, 2020; ROSANO & CECCARELLI, 2014). Devido ao extenso conhecimento acerca de sua fisiologia e genética, pesquisas realizadas ao longo dos anos, envolvendo a expressão heteróloga nesse hospedeiro, levaram ao desenvolvimento de inúmeras linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas para melhor atender aos diferentes tipos de proteínas e condições de expressão (LAMBERTZ *et al.*, 2014; ROSANO & CECCARELLI, 2014). Soma-se ainda a ampla variedade de vetores comercialmente disponíveis e meios de cultivo bem estabelecidos, que fazem com que a *E. coli* seja a plataforma de expressão bacteriana mais considerada para ambas as pesquisas básica e aplicada (LAMBERTZ *et al.*, 2014).

Entretanto, se modificações pós-traducionais eucarióticas (como a glicosilação) são requeridas, um sistema procariótico pode não ser o mais apropriado para a obtenção de uma proteína recombinante funcional (ROSANO & CECCARELLI, 2014). Além disso, a maioria das proteínas exógenas expressas em *E. coli* são intracelulares e comumente formam agregados insolúveis denominados corpos de inclusão. Estes últimos requerem exaustivas etapas até serem solubilizados e, posteriormente, reenovelados, o que, além de aumentar o custo do processo, não garante a obtenção de uma proteína funcional (ALI *et al.*, 2020; LAMBERTZ *et al.*, 2014).

1.5.2 *Pichia pastoris*: um eficiente hospedeiro eucarioto

Sistemas de expressão eucarióticos possuem como principal vantagem a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, que possibilita a obtenção de proteínas recombinantes com características estruturais e funcionais mais próximas às da versão nativa (ALI *et al.*, 2020). Nos últimos anos, a levedura *Pichia pastoris* tem sido um dos hospedeiros eucariotos mais considerados para a expressão heteróloga de proteínas devido às suas inúmeras vantagens frente a outros sistemas de expressão (ALI *et al.*, 2020; CHAHED *et al.*, 2018).

Essa levedura se destaca por ser metilotrófica, ou seja, capaz de crescer em um meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono, sendo esse um substrato simples e barato (YANG *et al.*, 2019; CEREGHINO & CREGG, 2000). Essa habilidade é atribuível à hiperexpressão de enzimas envolvidas no metabolismo do metanol quando as células de levedura são cultivadas na presença desse composto, e é justamente a base conceitual do sistema de expressão de *P. pastoris* (CEREGHINO & CREGG, 2000).

No genoma de *P. pastoris* estão presentes dois genes codificantes da enzima álcool oxidase (AOX): AOX1 e AOX2, responsáveis por catalisar o primeiro passo na via metabólica do metanol, que envolve a oxidação do mesmo a formaldeído e H₂O₂ (ALI *et al.*, 2020; CEREGHINO & CREGG, 2000). Contudo, a maior parte da atividade na célula é atribuída ao produto do gene AOX1 (CEREGHINO & CREGG, 2000).

O forte promotor da AOX1 (P_{AOX1}) é altamente regulado por dois mecanismos (um de repressão/desrepressão e um de indução): o mesmo é fortemente reprimido quando *P. pastoris* é cultivada na presença de glicose, glicerol ou etanol, e, uma vez esgotadas essas fontes de carbono do meio, é desreprimido; contudo, a expressão do gene AOX1 só é induzida após a adição de metanol (ALI *et al.*, 2020; CHAHED *et al.*, 2018; AHMAD *et al.*, 2014; CEREGHINO & CREGG, 2000). Desse modo, a inserção de genes exógenos no genoma de *P. pastoris* por recombinação homóloga no locus P_{AOX1} constitui um dos métodos mais considerados pelos pesquisadores, uma vez que possibilita que grandes quantidades das proteínas recombinantes de interesse (na faixa de miligramas a gramas) sejam expressas, de forma facilmente regulada, a um baixo custo (ALI *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2019; CHAHED *et al.*, 2018; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2016; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

Existem diferentes linhagens de *P. pastoris*, as quais se distinguem entre si com relação à utilização de metanol. A maioria delas exibe um fenótipo Mut⁺ (*Methanol Utilization Plus*), referindo-se a uma alta taxa de crescimento em metanol, equiparável à da levedura selvagem, decorrente da presença de ambos os genes AOX1 e AOX2 funcionais (CEREGHINO &

CREGG, 2000). A ruptura do gene AOX1 resulta em cepas com fenótipo Mut^s (*Methanol Utilization Slow*), que caracteriza uma redução na habilidade das células de metabolizar metanol e, portanto, um crescimento deficitário na presença do mesmo como fonte de carbono (CEREGHINO & CREGG, 2000). Quando os dois genes codificantes da álcool oxidase estão inativos no genoma, tem-se uma cepa com fenótipo Mut⁻ (*Methanol Utilization Minus*), que é incapaz de crescer em metanol. Os três fenótipos são úteis, cada qual podendo favorecer a melhor expressão de uma dada proteína do que o outro. Além disso, independente do fenótipo, todas essas cepas retêm a capacidade de expressar altos níveis das proteínas recombinantes a partir do promotor P_{AOX1} (CEREGHINO & CREGG, 2000).

Por fim, soma-se ainda como vantagens do sistema de *P. pastoris*, de um lado a alta capacidade de secretar proteínas recombinantes e, de outro, a baixa secreção de proteínas endógenas (das quais nenhuma foi identificada até o momento como sendo lignocelulolítica), o que simplifica o subsequente processo de purificação (ALI *et al.*, 2020; CHAHED *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2016; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2016; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

Nesse sentido, considerando que ambos os hospedeiros descritos possuem características favoráveis ao uso como sistemas de expressão heteróloga, as enzimas selecionadas para este estudo – Af-EGL7, AfCel6A e Af-XYLA – foram expressas, purificadas e caracterizadas quanto às suas propriedades bioquímicas e cinéticas e aos seus potenciais para aplicações biotecnológicas.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi investigar as propriedades (bioquímicas e cinéticas) e os potenciais biotecnológicos de três enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* Af293, as quais haviam sido previamente identificadas em análises de transcriptoma e secretoma desse fungo cultivado na presença de bagaço de cana-de-açúcar explodido. Para um melhor entendimento, os objetivos específicos do projeto foram apontados para cada enzima individualmente:

A) Endo-1,4- β -glucanase (Af-EGL7)

- Análises de sequência e estrutura utilizando *softwares* de bioinformática;
- Clonagem do gene Afu6g01800 (*Af-egl7*) nos plasmídeos pET-28a(+) e pPICZ α A para posterior expressão heteróloga nas respectivas cepas *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS e *P. pastoris* X-33;
- Purificação da enzima recombinante produzida em *E. coli* na forma de corpos de inclusão e purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel da Af-EGL7 produzida em *P. pastoris*;
- Determinação da atividade enzimática sobre o substrato carboximetilcelulose (CMC) através do método DNS;
- Caracterização bioquímica e cinética enzimática;
- Avaliação do potencial da enzima de atuar sinergicamente com celulases comerciais (Celluclast[®]1.5L) durante a sacarificação de diferentes biomassas lignocelulósicas.

B) Celobiohidrolase (AfCel6A)

- Clonagem do gene Afu3g01910 (*Afcel6A*) no plasmídeo pPICZ α A para posterior expressão heteróloga em *P. pastoris* X-33;
- Purificação da AfCel6A por cromatografia de afinidade em resina de níquel;
- Determinação da atividade enzimática sobre o substrato CMC através do método DNS;
- Caracterização bioquímica e cinética enzimática;

- Ensaios de sinergismo envolvendo diferentes combinações da AfCel6A com o coquetel Celluclast® 1.5L, ou com a Af-EGL7 expressa em *P. pastoris*, durante a hidrólise de CMC;
- Ensaios de sinergismo utilizando as melhores combinações entre as enzimas (previamente determinadas através das reações com CMC) durante a sacarificação de biomassas lignocelulósicas.

C) Endo-1,4- β -xilanase (Af-XYLA)

- Análises de sequência e estrutura utilizando *softwares* de bioinformática;
- Clonagem do gene Afu6g13610 (*Af-xylA*) no plasmídeo pPICZaA para posterior expressão heteróloga em *P. pastoris* X-33;
- Purificação da Af-XYLA por cromatografia de afinidade em resina de níquel;
- Determinação da atividade enzimática sobre xilana de madeira de faia através do método DNS;
- Caracterização bioquímica e cinética enzimática;
- Aplicação de um DCCR 2³ para otimizar fatores operacionais importantes para a sacarificação de biomassas lignocelulósicas e, assim, maximizar o rendimento de açúcares redutores;
- Ensaios de sinergismo utilizando os valores ótimos dos parâmetros operacionais (previamente determinados por métodos estatísticos) durante a sacarificação de biomassas lignocelulósicas.

3 Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS, MEIOS DE CULTIVO E PLASMÍDEOS

A cepa *Aspergillus fumigatus* Af293 foi cultivada em meio sólido YAG [2% (p/v) dextrose; 2% (p/v) ágar; 0,5% (p/v) extrato de levedura; 0,1% (v/v) solução de elementos traços] a 37 °C, durante 2-3 dias. Após esse período, as placas foram raspadas para preparo de suspensão de conídios em água destilada estéril, a qual foi filtrada utilizando lã de vidro e armazenada a 4 °C. A partir dessa suspensão, foi feito um pré-inóculo de 10⁸ conídios em 50 mL de meio líquido YNB [5% (v/v) solução de sais 20X; 0,1% (v/v) solução de elementos traços; 0,05% (p/v) extrato de levedura] contendo 1% (p/v) frutose e a cultura foi incubada a 37 °C e 200 rpm (Incubadora *Shaker* Solab SL-223) por 16 horas. Posteriormente, os micélios foram lavados com água destilada estéril, transferidos para 50 mL de meio líquido YNB contendo 1% (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar explodido (SEB, *sugarcane exploded bagasse*), e incubados a 37 °C e 200 rpm por 24 horas.

A cepa *Escherichia coli* DH10 β foi utilizada para propagação do vetor de clonagem recombinante *Af-egl7/pGEM*®-T Easy. Após a transformação com o plasmídeo recombinante, as bactérias competentes foram cultivadas por 16 horas a 37 °C em 20 mL de meio sólido Luria-Bertani (LB) [1,5% (p/v) ágar; 1% (p/v) triptona; 1% (p/v) NaCl; 0,5% (p/v) extrato de levedura] contendo ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), bem como X-Gal (32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e IPTG (32 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para seleção dos clones positivos.

A cepa *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS foi utilizada para expressão heteróloga da endo-1,4- β -glucanase recombinante de *A. fumigatus*, *Af-EGL7*. As células competentes de *E. coli* foram transformadas com o vetor de expressão recombinante *Af-egl7/pET-28a(+)* e, em seguida, cultivadas por 16 horas a 37 °C em meio sólido LB contendo os antibióticos kanamicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e cloranfenicol (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para seleção dos clones transformantes.

A cepa *E. coli* DH10 β também foi utilizada para propagação dos vetores de expressão recombinantes *Af-egl7/pPICZ α A*, *Afcel6A/pPICZ α A* e *Af-xylA/pPICZ α A*. Após as transformações com os plasmídeos recombinantes, as bactérias foram cultivadas por 16 horas a 37 °C em meio sólido LB *Low Salt* [1,5% (p/v) ágar; 1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) NaCl; 0,5% (p/v) extrato de levedura] contendo zeocina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para seleção dos clones transformantes.

A cepa selvagem *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen) foi utilizada para expressão heteróloga das enzimas recombinantes de *A. fumigatus* Af-EGL7, AfCel6A e Af-XYLA. Após a transformação com os vetores pPICZαA recombinantes, as células de levedura foram cultivadas em meio de seleção YPDS [1 M sorbitol; 2% (p/v) peptona; 2% (p/v) dextrose; 2% (p/v) ágar; 1% (p/v) extrato de levedura] contendo zeocina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 3 dias a 30 °C.

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

A cultura de *A. fumigatus* em SEB, realizada conforme descrito no item 3.1, foi filtrada a vácuo para separação de micélio e sobrenadante. Os micélios foram congelados em nitrogênio líquido e macerados com pistilo até a obtenção de um pó fino, a partir do qual foi realizada a extração do RNA total utilizando-se o kit Direct-zolTM RNA MiniPrep (Zymo Research), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e tratadas com RQ1 RNase-free DNase (Promega). Procedeu-se com a purificação dos RNAs utilizando-se a mistura fenol/clorofórmio 1:1, da maneira que se segue:

Adicionou-se volume da mistura equivalente ao volume de amostra, homogeneizou-se durante 1 minuto e centrifugou-se a 15294 g por 10 minutos a 4 °C. Após transferir a fase aquosa para outro tubo, adicionou-se 200 μL de isopropanol e deixou-se precipitando a -20 °C por no mínimo 30 minutos. Foi realizada nova centrifugação a 15294 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70% (v/v) gelado. Em seguida, centrifugou-se durante 1 minuto nas mesmas condições e descartou-se o sobrenadante. Por fim, o precipitado completamente seco foi eluído em 30 μL de H₂O livre de RNase.

A integridade dos RNAs foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (reagentes e quantidades utilizados no preparo do gel descritos abaixo), em condições desnaturantes. Foram aplicadas quantidades na faixa de 500 a 1000 ng de RNA. As amostras foram preparadas através da adição de tampão de carregamento 5X para RNA e GelRed 1:500 (corante intercalante de ácidos nucleicos). A corrida foi processada em cuba eletroforética contendo o tampão de corrida apropriado, a uma diferença de potencial de 90 V.

Gel desnaturante de agarose

Agarose.....	0,84 g
Tampão MOPS 10X pH 7,0.....	7 mL
H ₂ O milli-Q	63 mL
Formaldeído*.....	1,26 mL

* Adicionado após a dissolução da agarose e o resfriamento da solução

Os cDNAs foram sintetizados a partir dos RNAs extraídos utilizando-se a enzima transcriptase reversa (SuperScript® II Reverse Transcriptase, Invitrogen), segundo as instruções do fabricante.

3.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *E. coli*, PURIFICAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE E *REFOLDING*

3.3.1 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados de modo a inserir sítios de restrição específicos na sequência do gene Afu6g01800 (*Af-egl7*) (Tabela 1), para posterior clonagem no plasmídeo de expressão pET-28a(+) (Novagen).

Tabela 1 – Sequências dos *primers* que foram utilizados na amplificação do gene *Af-egl7* para posterior clonagem no vetor pET-28a(+)

Nome	Sequência (5'-3')*	Tamanho (pb)
<i>Af-egl7</i> F <i>Eco</i> RI	<u>GAATTC</u> ATGGACTCCAAAAGAGGCGT	26
<i>Af-egl7</i> R <i>Hind</i> III	<u>AAGCTT</u> CTACAGACACTGAGAGTACC	26

*As partes sublinhadas correspondem aos sítios das enzimas de restrição

3.3.2 Amplificação por PCR

A sequência codificadora do gene *Af-egl7* foi amplificada a partir do cDNA sintetizado (item 3.2) através de reações em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) realizadas em termociclador (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf). Para tanto, o cDNA foi adicionado em meio reacional contendo os *primers* F e R (item 3.3.1) na concentração final de 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dNTPs 0,2 mmol L^{-1} , MgSO_4 2 mmol L^{-1} , tampão de reação 1X e 1,0 U da enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), em um volume final de 50 μL . As

condições de termociclagem utilizadas foram: 94 °C por 5'; 30 ciclos de 1' a 94 °C, 1' a 55 °C e 2' a 68 °C; e 68 °C por 10'. Após a reação, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) (1% (p/v) em tampão TAE 1X). Para tanto, foram adicionados à amostra tampão de carregamento de DNA 6X (Sinapse) e GelRed (Biotium) 20X (para as respectivas concentrações finais 1X e 4X), e a mistura foi aplicada no gel. A corrida eletroforética foi processada em cuba contendo tampão de corrida TAE 1X, a uma diferença de potencial constante de 110 V. Ao final da eletroforese, a banda correspondente ao gene de interesse foi recortada e purificada através do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.3 Preparo de células de *E. coli* quimiocompetentes

Uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido e incubada por 16 horas a 37 °C e rotação de 200 rpm. Após esse período, 2 mL dessa cultura foram transferidos para 50 mL de meio SOB [2% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extrato de levedura; 0,05% (p/v) NaCl, 10 mM MgCl₂ e 2,5 mM KCl], com posterior incubação sob as mesmas condições anteriores até atingir uma D.O._{600nm} (densidade óptica em 600 nm) equivalente a 0,6. Posteriormente, a cultura foi mantida no gelo por 10 minutos e, então, centrifugada a 2500 g, a temperatura de 4 °C, por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi ressuspensionado cuidadosamente em 16 mL de solução TB resfriada e, em seguida, mantido no gelo por mais 10 minutos. Após esse tempo, foi realizada nova centrifugação por 10 minutos nas mesmas condições, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspensionado em 4 mL de solução TB, com posterior adição de 300 µL de DMSO. As bactérias foram mantidas no gelo por mais 10 minutos e, por fim, foram separadas alíquotas de 200 µL da suspensão para estocagem em freezer a -80 °C.

3.3.4 Clonagem do gene *Af-egl7* no vetor pGEM®-T Easy, transformação de *E. coli* DH10β e *screening* dos clones recombinantes

A clonagem do gene *Af-egl7* no plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega) foi realizada segundo as instruções fornecidas no manual do vetor. Após o término da reação, procedeu-se com a transformação de *E. coli* DH10β quimiocompetente por choque térmico:

A 100 µL da suspensão de bactérias competentes, preparadas conforme o procedimento descrito no item 3.3.3, foram misturados 10 µL do produto da reação de ligação. Após

homogeneização cuidadosa, as bactérias foram mantidas no gelo durante 30 minutos. Logo após esse tempo de incubação, as mesmas foram submetidas a temperatura de 42 °C por 45 segundos e imediatamente transferidas para o gelo por mais 3 minutos, para que ocorresse choque térmico e os plasmídeos adentrassem às células. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de meio SOC [meio SOB acrescido de 20 mM de glicose e 10mM de MgCl₂] e as bactérias foram incubadas a 37 °C com rotação de 200 rpm por 1 hora. O conteúdo total da transformação foi semeado em meio sólido LB contendo ampicilina, X-Gal e IPTG para seleção dos clones transformantes recombinantes. A clonagem bem-sucedida de um inserto no vetor pGEM®-T Easy interrompe a sequência codificadora da β-galactosidase (*lacZ*) presente no mesmo e, portanto, não há degradação do substrato cromogênico X-Gal. Desse modo, os clones recombinantes podem ser identificados através de um *screening* de cores: colônias brancas sugerem a presença do inserto, enquanto as azuis são indicativas de que a ligação não ocorreu. Assim, finalizadas as 16 horas de crescimento a 37 °C, procedeu-se com a PCR das colônias brancas como um último passo para verificar se os clones eram efetivamente positivos.

3.3.5 PCR de colônia e Miniprep

As colônias brancas foram inoculadas em 1 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg mL⁻¹) e incubadas a 37 °C e 200 rpm durante 16 horas. Após esse período, 3 µL de cada cultura foram adicionados aos meios reacionais contendo os *primers* F e R (item 3.3.1) na concentração final de 0,4 µmol L⁻¹, dNTPs 0,2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, tampão de reação 1X e 1,0 U da enzima *Taq* DNA Polymerase (Sinapse), em um volume final de 50 µL. Procedeu-se com as PCRs nas seguintes condições de termociclagem: 94 °C por 5'; 30 ciclos de 1' a 94 °C, 1' a 55 °C e 2' a 72 °C; e 72 °C por 10'. Após as reações, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

Uma vez confirmada a presença do inserto, um clone positivo foi inoculado em 10 mL de meio LB adicionado de ampicilina e cultivado a 37 °C e 200 rpm durante 16 horas. A cultura foi centrifugada a 6800 g por 3 min e o *pellet* celular foi submetido à extração plasmidial (Miniprep) utilizando-se o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), segundo as instruções do fabricante.

3.3.6 Análise do gene *Af-egl7* por sequenciamento

Após a realização de Miniprep, o vetor recombinante foi preparado para as reações de sequenciamento (SANGER *et al.*, 1977), de acordo com as instruções fornecidas no manual do kit Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Os sequenciamentos foram realizados no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), no Laboratório de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos (*Facility* de Pesquisa da FCFRP-USP). Uma vez confirmada a ausência de mutações na sequência codificadora do gene *Af-egl7*, prosseguiu-se com a digestão e clonagem do mesmo no vetor de expressão pET-28a(+).

3.3.7 Digestão e clonagem do gene *Af-egl7* no vetor pET-28a(+)

O plasmídeo recombinante *Af-egl7/* pGEM[®]-T Easy foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* para liberação do inserto. Em seguida, realizou-se a clonagem do gene *Af-egl7* no plasmídeo de expressão pET-28a(+) (previamente digerido com ambas as enzimas mencionadas acima) de acordo com as instruções fornecidas no manual do vetor, utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific). As reações foram processadas durante 1 hora a temperatura ambiente, em concordância com as recomendações descritas no manual da enzima.

3.3.8 Transformação de *E. coli* Rosetta[™] (DE3) pLysS

As células competentes de *E. coli* Rosetta[™] (DE3) pLysS, preparadas conforme a descrição no item 3.3.3, foram transformadas com o produto da reação de ligação (item 3.3.7) de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.4, com algumas modificações. Após a incubação em meio SOC durante 1 hora a 37 °C e 200 rpm, o conteúdo total da transformação foi semeado em meio sólido LB contendo cloranfenicol (25 µg mL⁻¹) e kanamicina (50 µg mL⁻¹) para seleção dos clones transformantes. A placa foi incubada em estufa a 37 °C durante 16 horas e, após esse período, procedeu-se com a PCR das colônias.

3.3.9 Expressão heteróloga da endoglucanase *Af-EGL7* em *E. coli* Rosetta[™] (DE3) pLysS

Após a confirmação por PCR de colônia, as células de *E. coli* carregando o vetor recombinante *Af-egl7/pET-28a(+)* foram inoculadas em 10 mL de meio líquido LB contendo

kanamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), cloranfenicol ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 1% (p/v) glicose, e incubadas a 37°C e 200 rpm durante 16 horas. Após esse período, a cultura foi diluída 20x em meio Terrific-Broth (TB) [2,4% (p/v) extrato de levedura; 1,2% (p/v) triptona; 0,4% (v/v) glicerol; 72 mM K_2HPO_4 e 17 mM KH_2PO_4] contendo os mesmos antibióticos e suplementado com 1% glicose, para crescimento sob as mesmas condições até atingir um valor de $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ entre 0,4 e 0,6. Posteriormente, adicionou-se IPTG para a concentração final de 1 mM e a indução da expressão gênica foi realizada a 37°C e 200 rpm durante 4 horas sob o controle do promotor *T7lac*. Após esse período, avaliou-se a expressão da proteína por SDS-PAGE (reagentes e quantidades utilizadas no preparo de um gel descritos abaixo), de acordo com Laemmli (1970).

Gel de empacotamento 5%

Acrilamida/bis-acrilamida 30%.....	325 μL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.....	250 μL
SDS 10% (p/v).....	20 μL
Persulfato de amônio 10% (p/v).....	20 μL
TEMED (Bio-Rad).....	2,5 μL
H_2O deionizada.....	1382 μL
Volume final de gel.....	2000 μL

Gel de corrida 10%

Acrilamida/bis-acrilamida 30%.....	1675 μL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.....	1250 μL
SDS 10% (p/v).....	50 μL
Persulfato de amônio 10% (p/v).....	50 μL
TEMED (Bio-Rad).....	2,5 μL
H_2O deionizada.....	1975 μL
Volume final de gel.....	5000 μL

3.3.10 Purificação dos corpos de inclusão e *refolding*

Após a expressão proteica, a cultura foi centrifugada a 18514 g, a 4°C , por 10 minutos, para obtenção do *pellet* celular. Uma vez que a enzima *Af-EGL7* foi expressa na forma de corpos de inclusão, procedeu-se com a purificação dos mesmos de acordo com os protocolos descritos no kit iFOLD™ Protein Refolding System I (Novagen), com algumas modificações:

Inicialmente, as células de *E. coli* foram ressuspensas em Tampão de Ressuspensão 1X (10 mL/g de *pellet*). Então, adicionou-se 20 μ L de lisozima (Sigma-Aldrich) 50 mg mL⁻¹ para cada grama de *pellet* e incubou-se durante 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação leve. Em seguida, as células foram lisadas por sonicação (5 pulsos de 10 segundos (amplitude 50%) com intervalos de 10 segundos no gelo) e adicionou-se Triton X-100 para a concentração final de 1% (v/v). Após 15 minutos de agitação leve a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 8000 g, a 10 °C, durante 15 minutos e procedeu-se com as etapas de lavagem do *pellet*. Para cada grama de *pellet* foram adicionados 10 mL de Tampão de Lavagem 1X, seguido de homogeneização em agitador *vortex*, centrifugação a 8000 g a 10 °C por 15 minutos, e descarte do sobrenadante. Essa etapa de lavagem foi repetida por mais 4 vezes. O *pellet* foi ressuspendido em Tampão de Ressuspensão 1X (10 mL/g de *pellet*) para remover resíduos de Triton X-100 e procedeu-se com nova centrifugação sob as mesmas condições anteriores. Esse procedimento foi repetido por mais 3 vezes e, após a última centrifugação, deu-se início à desnaturação dos corpos de inclusão. Para tanto, foram adicionados 10 mL de Tampão de Desnaturação 1X para cada 0,5 g de *pellet*, seguido de homogeneização completa e sonicação (mesmas condições anteriores). Subsequentemente, adicionou-se lauril sulfato de sódio (SLS) 30% (1,75 mL para 0,5 g de *pellet*) e incubou-se a solução até que a mesma se tornasse límpida (1 h e 50 min de agitação suave a temperatura ambiente, seguido de 10 min em banho-maria a 37 °C), indicando a solubilização dos corpos de inclusão. Por fim, a solução foi dialisada contra o Tampão de Diálise 1X durante aproximadamente 20 horas a 4 °C sob agitação. Para o processo de *refolding* da enzima, foi utilizado um dos tampões sugeridos no kit iFOLD™ Protein Refolding System I. Mais especificamente, a solução contendo a Af-EGL7 recombinante foi aplicada em membrana de diálise (Fisher Scientific), embebida em tampão C9 [Tris-HCl 50 mM; Ciclodextrina 12,5 mM; EDTA 1 mM; pH 7,5] e incubada a 4 °C durante 48 horas, sob agitação. Após esse período, a enzima foi concentrada em filtro para centrífuga Amicon Ultra-15 (Millipore), com limite de corte de 10 kDa. A quantificação da enzima pura e concentrada foi realizada através do método de Greenberg (GREENBERG, 1929).

3.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *P. pastoris* E PURIFICAÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES

3.4.1 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados de modo a inserir regiões de sobreposição com o vetor pPICZαA (Invitrogen) nas sequências dos genes Afu6g01800 (*Af-egl7*), Afu3g01910 (*Afcel6A*) e Afu6g13610 (*Af-xylA*) (Tabela 2), para posterior clonagem através do método CPEC (*Circular Polymerase Extension Cloning*).

Tabela 2 – Sequências dos *primers* que foram utilizados na amplificação e na clonagem dos genes *Af-egl7*, *Afcel6A* e *Af-xylA* no vetor pPICZαA pelo método CPEC

Nome	Sequência (5'-3')*	Tamanho (pb)
<i>Af-egl7</i> F	<u>GAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCC</u> AACAACCCGCCGCG	42
<i>Af-egl7</i> R	ATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC <u>TAGCAGACACTGAGAGTA</u>	45
<i>Afcel6A</i> F	<u>GAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCC</u> CAGCAGACCGTATGG	42
<i>Afcel6A</i> R	ATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC <u>TAGAAAGGACGGGTTAGC</u>	45
<i>Af-xylA</i> F	<u>GAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCC</u> GCTGGCCTGAACACA	42
<i>Af-xylA</i> R	ATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC <u>TAGCAGGCACTGTGAGTA</u>	45

*As regiões de sobreposição estão sublinhadas

3.4.2 Amplificação por PCR

As sequências dos genes *Af-egl7*, *Afcel6A* e *Af-xylA* (sem os nucleotídeos que codificam os peptídeos sinais e sem os códons de parada) foram amplificadas por PCR utilizando os *primers* específicos mencionados acima (item 3.4.1) e a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Para tanto, o cDNA de *A. fumigatus*, sintetizado conforme descrito no item 3.2, foi adicionado em meios reacionais contendo: Tampão de reação HF 1X, dNTPs 0,2 mmol L⁻¹, *primers* F e R 0,5 μmol L⁻¹, DMSO 3% (v/v) e 1 U da enzima Phusion HiFi, para um volume final de 50 μL. As condições de termociclagem utilizadas foram: 98 °C por 30"; 30 ciclos de 10" a 98 °C, 30" a 55 °C e 1' a 72 °C; e 72 °C por 10'. Após o término das PCRs, os produtos reacionais foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e os fragmentos amplificados foram purificados através do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4.3 Clonagem dos genes *Af-egl7*, *Afcel6A* e *Af-xylA* no vetor pPICZαA, transformação de *E. coli* DH10β competente e sequenciamento

Os fragmentos amplificados (item 3.4.2) foram clonados no vetor pPICZαA (previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*) através do método CPEC, de acordo com o protocolo descrito por QUAN & TIAN (2011). Brevemente, as reações foram realizadas com a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, nas seguintes condições de termociclagem: 98 °C por 30"; 35 ciclos de 10" a 98 °C, 30" a 55 °C e 2'30" a 72 °C; e 72 °C por 10'. Após as reações de clonagem, 5 µL dos produtos reacionais foram diretamente transformados em *E. coli* DH10β competente (preparada conforme o item 3.3.3) por choque térmico. As transformações foram realizadas conforme o procedimento do item 3.3.4 e os clones transformantes foram selecionados em meio LB *low salt* contendo zeocina 50 µg mL⁻¹. Após as 16 horas de crescimento em estufa a 37 °C, procedeu-se com a PCR das colônias para verificar quais eram efetivamente positivas. Para confirmar a ausência de mutações e averiguar se as sequências foram inseridas no vetor "in frame" com o peptídeo sinal fator α, foi realizado o sequenciamento (SANGER *et al.*, 1977) dos vetores recombinantes *Af-egl7*/pPICZαA, *Afcel6A*/pPICZαA e *Af-xylA*/pPICZαA no equipamento 3500 Genetic Analyzer, no Laboratório de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos (FCFRP-USP), seguindo as instruções do kit Big Dye® Terminator Cycle Sequencing v.3.1 (Applied Biosystems).

3.4.4 Transformação de *P. pastoris* competente

3.4.4.1 Preparo de células eletrocompetentes

As células eletrocompetentes de *P. pastoris* foram preparadas de acordo com as recomendações do manual do kit EasySelect™ *Pichia* Expression (Invitrogen), da maneira que se segue:

Uma colônia de *P. pastoris* X-33 foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido [2% (p/v) peptona; 2% (p/v) dextrose; 1% (p/v) extrato de levedura] e incubada em temperatura de 30 °C e rotação de 200 rpm por 16 horas. Após esse período, 80 µL dessa cultura foram transferidos para 100 mL de meio YPD para crescimento, sob as mesmas condições, até atingir um valor de D.O._{600nm} entre 1,3 e 1,5. Em seguida, foram realizadas 4 etapas de centrifugação, cada uma com duração de 5 minutos, em rotação de 1500 g e temperatura de 4 °C. Após a primeira centrifugação, as células foram ressuspensas com 100 mL de água destilada estéril gelada.

Após a segunda centrifugação, as células foram ressuspensas com 50 mL de água destilada estéril gelada. Após a terceira centrifugação, as células foram ressuspensas em 4 mL de sorbitol 1 mol L⁻¹ gelado. Desse volume, 1,5 mL foram recolhidos, centrifugados e, por fim, as células foram ressuspensas em 200 µL de sorbitol 1 mol L⁻¹ gelado e mantidas no gelo para serem utilizadas no mesmo dia.

3.4.4.2 Transformação por eletroporação

Conforme as recomendações do manual do kit EasySelect™ *Pichia* Expression, a 80 µL de células eletrocompetentes de *P. pastoris* X-33 foram adicionados 10 µg do vetor recombinante *Af-egl7/pPICZαA*, *Afcel6A/pPICZαA* ou *Af-xylA/pPICZαA* previamente linearizado com a enzima de restrição *PmeI*. As células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada e incubadas no gelo por 5 minutos. Após esse período, foram aplicados pulsos sobre as células de levedura (2 kV, 25 µF, 200 Ω) e, imediatamente, foi adicionado à cubeta 300 µL de sorbitol 1 mol L⁻¹ gelado. O conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo estéril para incubação a 30 °C sem agitação por 1 hora. Após esse tempo, 200 µL do conteúdo da transformação foi semeado em placa contendo meio YPDS sólido suplementado com zeocina 100 µg mL⁻¹. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 3 dias. Após esse período, procedeu-se com o *screening* dos clones de *P. pastoris* recombinantes.

3.4.4.3 *Screening* de clones positivos

Para verificar quais clones eram efetivamente positivos, realizou-se PCR das colônias de *P. pastoris* crescidas após transformação com o vetor *Afcel6A/pPICZαA* ou *Af-xylA/pPICZαA*. Para tanto, cada colônia selecionada foi ressuspensa em 20 µL de solução aquosa de SDS 0,2% (p/v) e, posteriormente, incubada a 90 °C por 5 minutos. Após esse período, os sobrenadantes foram separados por centrifugação a 17949 g por 30 segundos e utilizados como moldes para as PCRs. Mais especificamente, adicionou-se 1 µL de cada sobrenadante em meios reacionais contendo *primers* F e R na concentração final de 0,4 µmol L⁻¹, dNTPs 0,2 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, tampão de reação 1X e 1,0 U da enzima *Taq* DNA Polymerase, em um volume final de 50 µL. As condições de termociclagem utilizadas foram 94 °C por 5'; 30 ciclos de 1' a 94 °C, 1' a 55 °C e 2' a 72 °C; e 72 °C por 10'. Após as reações, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

As colônias de *P. pastoris* resultantes da transformação com o vetor *Af-egl7/ pPICZαA* foram, por sua vez, testadas quanto à atividade enzimática em meio sólido contendo celulose. Brevemente, um total de 24 colônias foram selecionadas para repique em meio sólido YPD contendo 1% (p/v) do substrato CMC e 1% (v/v) de metanol para indução, e incubadas a 30 °C por 3 dias. Após os 3 dias de crescimento, as placas foram coradas com 0,1% (p/v) de Vermelho Congo por 15 minutos e, em seguida, descoloridas com NaCl 1 mol L⁻¹.

Colônias de *P. pastoris* transformadas com o vetor pPICZαA vazio foram utilizadas como controle nos experimentos.

3.4.5 Expressão heteróloga das enzimas *Af-EGl7*, *AfCel6A* e *Af-XYLA* em *P. pastoris* X-33

Após a confirmação dos clones positivos, procedeu-se com a produção heteróloga das enzimas recombinantes *Af-EGl7*, *AfCel6A* e *Af-XYLA*. Para tanto, uma colônia recombinante isolada de *P. pastoris* (contendo a construção *Af-egl7/pPICZαA*, *Afcel6A/pPICZαA* ou *Af-xyLA/pPICZαA* integrada ao seu genoma) foi inoculada em meio BMGY [2% (p/v) peptona; 1,34% (p/v) base de nitrogênio para levedura; 1% (p/v) extrato de levedura; 1% (v/v) glicerol; 4 10⁻⁵% (p/v) biotina; e 100 mM buffer fosfato de potássio, pH 6,0] e crescida a 30 °C e 240 rpm até atingir a fase log de crescimento (D.O._{600nm} = 2-6). Após esse período, a cultura foi centrifugada a 3000 g por 5 minutos e as células foram ressuspensas em volume suficiente de meio BMMY [2% (p/v) peptona; 1,5 ou 1% (v/v) metanol; 1,34% (p/v) base de nitrogênio para levedura; 1% (p/v) extrato de levedura; 4 10⁻⁵% (p/v) biotina; e 100 mM tampão fosfato de potássio, pH 6,0] para se obter uma D.O._{600nm} igual a 1. As induções das enzimas recombinantes foram realizadas a 30 °C e 240 rpm durante 6 dias, com adição de metanol (1,5% (v/v) para ambas *Af-EGl7* e *AfCel6A* e 1% (v/v) para a *Af-XYLA*) a cada 24 horas para manutenção dos níveis de expressão.

3.4.6 Purificação das enzimas recombinantes por cromatografia de afinidade

Finalizados os 6 dias das induções por metanol, as culturas foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos para separação dos sobrenadantes. Em seguida, os mesmos foram concentrados ao máximo utilizando filtros para centrífuga Amicon Ultra-15, com limite de corte de 10 kDa. Os concentrados foram, então, ressuspensos em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo NaCl 500 mM (pH 7,4) e carregados em colunas contendo resina Ni Sepharose 6 Fast Flow

(GE Healthcare) pré-equilibrada com o mesmo tampão. Em seguida, gradientes lineares de 0 a 500 mM de imidazol foram aplicados para eluir as enzimas recombinantes *Af*-EGL7, *Af*-Cel6A e *Af*-XYLA fusionadas a caudas de histidina (His₆). Todas as frações recolhidas a partir das cromatografias foram analisadas por SDS-PAGE. Aquelas contendo as enzimas puras e em quantidades relevantes foram misturadas e submetidas à troca de tampão para remoção do excesso de imidazol antes da realização dos ensaios enzimáticos. As concentrações das enzimas puras foram determinadas pelo método de Greenberg (GREENBERG, 1929).

3.5 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA E ESTRUTURA

As predições dos peptídeos sinais e dos potenciais sítios de N-glicosilação nas sequências das enzimas foram realizadas através dos *softwares* SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), respectivamente. As modelagens por homologia foram realizadas com o *software* Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) para predição das estruturas tridimensionais das proteínas recombinantes. As estruturas 3D obtidas foram, então, analisadas com o auxílio do *software* Swiss PDB viewer. Informações sobre os possíveis resíduos catalíticos e a presença de resíduos de cisteína aptos a formarem pontes dissulfeto foram obtidas através do alinhamento múltiplo das sequências proteicas com sequências de alta homologia, utilizando-se a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.6 DEGLICOSILAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS EM *P. pastoris*

A deglicosilação da *Af*-EGL7 recombinante produzida em *P. pastoris* foi realizada utilizando a enzima Endoglicosidase H (Endo H) (New England Biolabs), em ambas condições desnaturante e não-desnaturante, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. No primeiro caso, a proteína recombinante foi inicialmente desnaturada a 100 °C por 10 minutos. Então, a reação de deglicosilação foi processada a 37 °C por 24 horas, de acordo com Meleiro *et al.* (2018). A deglicosilação foi realizada da mesma maneira para ambas *Af*-Cel6A e *Af*-XYLA, mas somente em condição não-desnaturante. Após o término das reações, as enzimas foram analisadas por SDS-PAGE.

3.7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA *Af*-EGL7, *Af*Cel6A e *Af*-XYLA ATRAVÉS DO MÉTODO DNS

Uma vez purificadas, as atividades enzimáticas da *Af*-EGL7, *Af*Cel6A e *Af*-XYLA foram determinadas medindo-se os açúcares redutores liberados nas reações através do método DNS (MILLER, 1959). Para tanto, foram utilizados como substratos CMC de baixa viscosidade (Sigma-Aldrich) 1% (p/v) para as duas primeiras e Xilana de madeira de faia (Megazyme) 1% (p/v) para a xilanase. As reações foram conduzidas sob as condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima. Para a endoglucanase, foi utilizado tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), enquanto para as outras duas enzimas utilizou-se tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0). Os tempos de reação foram 10 minutos para ambas *Af*-EGL7 e *Af*-XYLA, e 30-45 minutos para a *Af*Cel6A. As reações foram interrompidas pela adição de reagente DNS na proporção 1:1. As misturas foram incubadas por 5 minutos a 98 °C e, uma vez resfriadas até temperatura ambiente, procedeu-se com as leituras das absorbâncias em $\lambda = 540$ nm. Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor a partir do substrato por minuto.

3.8 ZIMOGRAMA DAS ENZIMAS *Af*-EGL7 e *Af*-XYLA

As atividades das enzimas *Af*-EGL7 e *Af*-XYLA também foram avaliadas através de zimogramas em géis SDS-PAGE. Para tanto, foram preparados géis de poliacrilamida 10% contendo 1% (p/v) CMC, 1% (p/v) β -glucana de cevada de média viscosidade (Megazyme) ou 0,5% (p/v) xilana. Previamente às aplicações nos géis, as enzimas (10 μ g) foram preparadas através da adição de tampão de amostra 5x não-redutor (sem β -mercaptoetanol). As eletroforeses foram processadas com baixa voltagem (80-90 V). Após as corridas, os géis foram lavados duas vezes durante 30 minutos em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) contendo 1% (v/v) Triton X-100, para remover o SDS e permitir o *refolding* das proteínas. Posteriormente, foi realizada uma lavagem durante 15 minutos em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) para remoção do Triton X-100 e, em seguida, os géis foram incubados nesse mesmo tampão por 30 minutos a 50 °C. Posteriormente, os géis foram corados com Vermelho Congo 0,1% (p/v) por 30 minutos. Para a descoloração, foi utilizada solução de NaCl 1 M. Todas as incubações foram realizadas sob agitação. O aparecimento de bandas de coloração vermelho pálido indicou que houve hidrólise enzimática.

3.9 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DAS ENZIMAS *Af*-EGL7, *Af*Cel6A e *Af*-XYLA

3.9.1 pH e temperatura ótimos

Os valores ótimos de pH para as atividades enzimáticas foram determinados na faixa de 3,0-8,0, utilizando-se tampão McIlvaine (ácido cítrico- Na_2HPO_4), em temperatura de 50 °C. As temperaturas ótimas da *Af*-EGL7, *Af*Cel6A e *Af*-XYLA foram determinadas nas respectivas faixas de 30-80 °C, 40-80 °C e 30-90°C, nos pH ótimos previamente estabelecidos (pH 5,0 para a *Af*-EGL7 e pH 6,0 para ambas *Af*Cel6A e *Af*-XYLA). As atividades relativas (%) foram calculadas considerando a atividade específica máxima exibida como 100%.

3.9.2 Estabilidade a diferentes condições de pH e temperatura

A estabilidade das enzimas a variações de pH foi avaliada medindo-se as atividades enzimáticas residuais nas condições reacionais ideais (pH e T ótimos) de cada uma, após pré-incubação das mesmas a 4 °C, na ausência de seus substratos, em diferentes pH e intervalos de tempo. A *Af*-EGL7 produzida em *E. coli* foi pré-incubada por 24 horas em uma faixa de pH de 3,0-8,0, em tampão McIlvaine. Para ambas *Af*-EGL7 e *Af*-XYLA produzidas em *P. pastoris*, as pré-incubações foram de até 72 horas em tampões McIlvaine pH 3,0-8,0. A *Af*Cel6A, por sua vez, foi pré-incubada em tampões McIlvaine pH 3,0-8,0 e em tampões Glicina-NaOH pH 9,0 e 10,0 por até 72 horas.

As termoestabilidades foram estimadas medindo-se as atividades residuais das enzimas após as mesmas terem sido pré-incubadas, na ausência de seus substratos, em diferentes condições de temperatura e intervalos de tempo. A *Af*-EGL7 produzida em *E. coli* foi submetida a uma faixa de 30-80 °C por 30 minutos e, ainda, às temperaturas de 50 e 55 °C por até 48 horas. A endoglucanase recombinante produzida em *P. pastoris*, por sua vez, teve sua estabilidade térmica avaliada na faixa de 55-90 °C por até 72 horas. Para a *Af*Cel6A, a pré-incubação foi de até 5 horas a 60-90 °C e de até 72 horas a 50 °C. Similarmente, a *Af*-XYLA foi pré-incubada por até 16 horas na faixa de temperatura de 40-90 °C e por até 72 horas a 50 °C.

Em todos os ensaios, os cálculos de atividade residual (%) foram realizados considerando as atividades específicas das enzimas sem pré-incubações como 100%.

3.9.3 Efeito da adição de metais e reagentes

Para investigar o efeito de íons metálicos e reagentes químicos sobre as atividades das enzimas, os mesmos foram adicionados individualmente aos sistemas reacionais em concentrações finais de 5 mM. As atividades relativas foram calculadas comparando-se os resultados obtidos em cada ensaio com as reações controle (100%) realizadas na ausência de qualquer aditivo. Estimou-se também o efeito de diferentes concentrações de MnCl_2 (0,1 a 20 mM) e CuSO_4 (0,1 a 15 mM) sobre as atividades da *Af-EGL7* produzida em *E. coli* e *P. pastoris*, respectivamente.

3.9.4 Atividade enzimática na presença de produtos reacionais

Investigou-se os efeitos dos produtos de hidrólise da celulose (glicose e celobiose) sobre as atividades de ambas *Af-EGL7* e *AfCel6A* produzidas em *P. pastoris*. Para a endoglucanase recombinante, foram utilizadas concentrações de 0,5 a 50 mM de ambos os açúcares e os ensaios foram realizados usando o substrato cromogênico Azo-Xyloglucan (Tamarind) (Megazyme), de acordo com as instruções do fabricante, com ligeiras modificações. Brevemente, as reações foram conduzidas em tampão acetato de sódio 85 mM (pH 4,5) a 40 °C e, após 10 minutos, foram interrompidas pela adição de 1,7 volumes de etanol absoluto. Os sobrenadantes foram separados por centrifugação a 1000 g durante 10 min, e as absorbâncias foram medidas a 590 nm.

Para a *AfCel6A* foram utilizadas concentrações finais de 10-250 mM de glicose e 10-100 mM de celobiose, e os ensaios foram realizados sobre o substrato sintético 4-nitrofenil β -D-celobiosídeo (pNPC) (Sigma–Aldrich), de acordo com DESHPANDE *et al.* (1984). As misturas reacionais consistiram em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo 5 mM de pNPC. As reações foram realizadas a 50 °C durante 45 minutos e, após esse tempo, interrompidas pela adição de Na_2CO_3 para a concentração final de 1 M. A liberação do produto pNP⁻ (íon *p*-nitrofenolato) foi determinada através da leitura das absorbâncias a 410 nm.

Os efeitos de D-xilose e D-glicose sobre a atividade da *Af-XYLA* recombinante foram determinados na presença de 10-250 mM desses açúcares, utilizando-se o substrato cromogênico Azo-Xylan (Beechwood) (Megazyme). Os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) a 40 °C por 10 min, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram interrompidas pela adição de 2,5 volumes de etanol absoluto.

Os sobrenadantes foram separados por centrifugação a 1700 g por 10 minutos, e as absorbâncias foram medidas a 590 nm.

Para investigar o efeito de etanol sobre a atividade da xilanase recombinante, concentrações de 0,5 a 50% (v/v) desse reagente foram adicionadas às misturas reacionais. Os ensaios enzimáticos foram realizados por 10 minutos a 50 °C, em tampão fosfato de sódio (pH 6,0) contendo 1% (p/v) xilana. Os açúcares redutores liberados nas reações foram determinados através do método DNS, conforme descrito no item 3.7.

As atividades enzimáticas na ausência de qualquer produto reacional foram consideradas 100%.

3.9.5 Especificidade por diferentes substratos

A especificidade por diferentes substratos da *Af*-EGL7 produzida em *E. coli* foi avaliada medindo-se a atividade enzimática da mesma sobre 0,5% (p/v) CMC, β -glucana, Xiloglucana de semente de tamarindo (Megazyme), Xilana ou Avicel® PH-101 (Sigma-Aldrich). As especificidades de ambas *Af*Cel6A e *Af*-XYLA foram investigadas sobre CMC, Avicel, Xiloglucana e Xilana, todos em concentração final de 0,5% (p/v). Para ambas as celulases, a reação com CMC foi considerada controle (100%), enquanto para a *Af*-XYLA considerou-se 100% a atividade sobre Xilana.

3.10 ANÁLISES ESTRUTURAIS DA *Af*-XYLA POR DICROÍSMO CIRCULAR E ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O espectro de Dicroísmo Circular (DC) foi obtido em um espectropolarímetro JASCO-810. A *Af*-XYLA ($0,000625 \mu\text{g mL}^{-1}$) diluída em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4) foi analisada entre 190 e 250 nm após pré-aquecimento de 30 minutos a 25, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 °C.

As leituras foram realizadas em quadruplicata em cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm, na velocidade de varredura, largura de banda e D.I.T. (*Digital Integration Time*) de 50 nm min⁻¹, 3 nm, e 1 s, respectivamente. Após descontar as contribuições do branco (tampão sem enzima), o espectro foi convertido de miligraus (mdeg) para $\Delta\epsilon$ (M⁻¹ cm⁻¹) de acordo com a equação (1):

$$\Delta\varepsilon = \frac{\theta.MRW}{d.c.32980} \quad (1)$$

na qual θ é o valor de elipticidade originalmente dado pelo equipamento (miligraus), MRW é o peso molecular médio dos resíduos da enzima (MRW, *mean residue weight*), d é o caminho óptico (cm), e c é a concentração de enzima (mg mL^{-1}). Todas as estruturas secundárias da enzima foram preditas através do *software* BeStSel a partir dos espectros de absorção.

As análises por espectroscopia de fluorescência ITFE (ITFE, *Intrinsic Tryptophan Fluorescence Emission*) foram realizadas em um espectrofluorímetro HITACHI-F4500. Utilizando-se as mesmas concentrações de enzima e condições de pré-aquecimento das amostras das análises por DC, os resíduos de triptofano presentes na sequência da Af-XYLA foram excitados a 295 nm e as emissões de fluorescência foram detectadas entre 300 e 450 nm. As leituras foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, na velocidade de varredura e intervalo de dados de 240 nm min^{-1} e 0,2 nm, respectivamente. A correção dos espectros obtidos foi realizada descontando-se a contribuição do branco.

Para determinar a T_m (*melting temperature*) aparente, as primeiras derivadas dos gráficos de Valores de elipticidade em 205 nm (obtidos a partir da análise por DC) x Temperatura e Valores de comprimento de onda máximo (obtidos a partir da análise por ITFE) x Temperatura foram calculadas no *software* OriginPro. Ambos os gráficos foram ajustados utilizando-se a função Boltzmann. Todos os gráficos analisados de DC e ITFE foram previamente suavizados com o filtro Savitzky-Golay (SAVITZKY & GOLAY, 1964).

3.11 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS Af-EGL7, AfCel6A e Af-XYLA

Os parâmetros cinéticos (K_M , $V_{\text{máx}}$ e k_{cat}) da Af-EGL7 produzida em *E. coli* foram determinados utilizando-se concentrações crescentes de CMC ($2,5\text{--}30 \text{ mg mL}^{-1}$) e β -glucana ($0,5\text{--}15 \text{ mg mL}^{-1}$). As reações foram realizadas durante 10 minutos em tampão acetato de sódio 50 mM, sob as condições ótimas de pH e temperatura (pH 5,0 e 55°C), e na presença de MnCl_2 5 mM. Os parâmetros foram calculados por regressão linear, através do método gráfico de Lineweaver-Burk. Para a Af-EGL7 produzida em *P. pastoris*, as reações foram realizadas de forma similar, mas não houve adição de Mn^{2+} . Além disso, as constantes cinéticas também foram determinadas sobre o substrato Xiloglucana ($1,0\text{--}8,5 \text{ mg mL}^{-1}$).

Os parâmetros cinéticos da *Af*Cel6A foram determinados utilizando-se concentrações crescentes do substrato CMC (0,5-30 mg mL⁻¹). As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) durante 30 minutos a 55 °C. Os parâmetros foram calculados por regressão não-linear, através do método gráfico de Michaelis-Menten.

Os parâmetros cinéticos da *Af*-XYLA foram determinados utilizando-se concentrações crescentes do substrato Xilana (0,5-30 mg mL⁻¹). As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) durante 10 minutos em ambas as temperaturas de 50 e 80 °C. Os parâmetros foram calculados por regressão não-linear, através do método gráfico de Michaelis-Menten.

3.12 ENSAIOS DE SINERGISMO

3.12.1 Efeito da associação entre o coquetel Celluclast®1.5L e a *Af*-EGL7 de *A. fumigatus* produzida em *E. coli* sobre a sacarificação de SEB

O sinergismo entre a *Af*-EGL7 produzida em *E. coli* (50 mg/g de substrato) e o coquetel Celluclast®1.5L (coquetel comercial confeccionado com celulasas de *T. reesei*; Sigma-Aldrich) (0,9 FPU/g de substrato) foi avaliado durante a sacarificação de SEB. Para tanto, as misturas reacionais consistiram de 1% (p/v) dessa biomassa em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0), contendo MnCl₂ 5 mM, em um volume final de 1 mL. As reações foram conduzidas em tubos Eppendorf de 2 mL, a 50 °C e 1000 rpm (utilizou-se termomixer Eppendorf), durante 24, 48 e 72 horas. Os controles do experimento foram realizados sob as mesmas condições, mas na ausência da endoglucanase recombinante. Os açúcares redutores liberados em cada ensaio foram determinados através do método DNS e os rendimentos percentuais foram calculados utilizando-se a equação (2):

$$Rendimento (\%) = \frac{\text{Açúcares redutores obtidos a partir da sacarificação da biomassa (mg)}}{\text{Quantidade de biomassa utilizada (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

Todos os resultados apresentados representam as médias $\pm$ desvios padrões calculadas a partir de pelo menos três repetições experimentais.

3.12.2 Efeito da associação entre o coquetel Celluclast®1.5L e a Af-EGL7 de *A. fumigatus* produzida em *P. pastoris* sobre a sacarificação de diferentes resíduos agroindustriais

Também avaliou-se o sinergismo entre a Af-EGL7 expressa em *P. pastoris* e o coquetel Celluclast®1.5L durante a sacarificação de biomassas lignocelulósicas. Mais especificamente, as hidrólises foram realizadas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) contendo 1% (p/v) de um dos seguintes resíduos agroindustriais: Bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, SEB, Palha de arroz, Sabugo de milho, Bagaço de cevada ou Palha de feijão. A Af-EGL7 e o coquetel foram adicionados aos meios reacionais nas respectivas concentrações de 1 mg e 0,9 FPU por grama de substrato. As reações foram conduzidas a 55° C e 1000 rpm por até 72 horas.

3.12.3 Efeito da associação entre ambas Af-EGL7 e AfCel6A de *A. fumigatus* produzidas em *P. pastoris* sobre a sacarificação de celulose

Investigou-se o efeito da associação entre ambas as celulasas recombinantes, AfCel6A e Af-EGL7, sobre a sacarificação de celulose. Os ensaios foram realizados com diferentes raios de concentração das enzimas AfCel6A e Af-EGL7 (50:1, 10:1, 1:1, ou 1:10); a quantidade de AfCel6A (50, 10, 1, ou 0,1 µg) adicionada por grama de substrato variou, enquanto a de Af-EGL7 foi fixada em 1 µg por grama. As misturas reacionais consistiram em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) contendo CMC 1% (p/v) em um volume final de 1 mL. As reações foram conduzidas a 50 °C e 1000 rpm pelos períodos de 4, 8 e 24 horas.

3.12.4 Efeito da associação entre o coquetel Celluclast®1.5L e a AfCel6A de *A. fumigatus* produzida em *P. pastoris* sobre a sacarificação de celulose

A ação sinérgica entre AfCel6A e Celluclast®1.5L durante a hidrólise de celulose também foi investigada. Para determinar a melhor combinação entre ambas (10:1, 1:1 ou 1:10), foram utilizadas diferentes quantidades da AfCel6A (50, 5 ou 0,5 µg) e 0,05 FPU de coquetel por grama de substrato. As reações foram realizadas conforme a descrição no item 3.12.3.

3.12.5 Efeito da associação entre *Af*Cel6A e *Af*-EGL7, ou entre *Af*Cel6A e Celluclast®1.5L, sobre a sacarificação de diferentes resíduos agroindustriais

As melhores associações entre as enzimas, definidas nos experimentos anteriores, foram utilizadas durante a sacarificação de biomassas lignocelulósicas. A *Af*-EGL7 ($18 \mu\text{g g}^{-1}$) foi associada à *Af*Cel6A ($180 \mu\text{g g}^{-1}$) na proporção 1:10. Celluclast®1.5L ($0,9 \text{ FPU g}^{-1}$) e *Af*Cel6A ($90 \mu\text{g g}^{-1}$), por sua vez, foram associados na proporção 1:1. As misturas reacionais consistiram em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) contendo 1% (p/v) de SEB, palha de arroz ou sabugo de milho em volume final de 1 mL. As reações foram conduzidas a 50 °C e 1000 rpm por 24 e 48 horas.

3.12.6 Avaliação do sinergismo entre o coquetel Celluclast®1.5L e a *Af*-XYLA recombinante de *A. fumigatus* produzida em *P. pastoris* durante a sacarificação das biomassas pré-tratadas SEB e SDB

3.12.6.1 Aplicação de DCCR associado a MSR como abordagem estatística para otimizar a sacarificação de SEB e SDB

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de experimentos foi aplicado para investigar a influência dos parâmetros A – Tween 20 (% (v/v)), B – Celluclast®1.5L (FPU/g de substrato), e C – *Af*-XYLA ($\mu\text{g/g}$ de substrato) sobre as hidrólises de bagaço de cana-de-açúcar explodido (SEB) e bagaço de cana-de-açúcar deslignificado (SDB, *Sugarcane Delignified Bagasse*) e para encontrar os melhores valores para esses 3 fatores operacionais, visando um rendimento otimizado de açúcares redutores.

Os fatores A, B e C foram considerados variáveis independentes, tendo como resposta o percentual de açúcares redutores liberados (variável dependente). Os parâmetros operacionais foram examinados em 5 diferentes níveis ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$), cujos valores codificados e reais estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores codificados e reais dos níveis das variáveis independentes

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
A - Tween 20 (% (v/v))	0	0,2	0,5	0,8	1
B – Celluclast®1.5L (FPU g ⁻¹)	0,2	0,5	1	1,5	1,8
C – Af-XYLA (µg g ⁻¹)	0	1	2,5	4	5

As reações de hidrólise foram realizadas em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) contendo 1% (p/v) de SEB ou SDB, a 50 °C e 1000 rpm, durante 48 horas. Os açúcares redutores (% (p/v)) liberados em cada ensaio foram determinados através do método DNS.

O modelo matemático usado para prever a variável resposta foi ajustado como uma equação polinomial de segunda ordem (3):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

na qual y é a resposta média predita, β_0 é o termo constante do modelo, β_i são os coeficientes dos termos lineares, β_{ii} são os coeficientes dos termos quadráticos, β_{ij} são os coeficientes dos termos de interação, e ε é o componente de erro aleatório que é determinado ajustando o modelo aos dados.

Uma Análise de Variância (ANOVA $p < 0,01$) foi realizada através do *software* STATISTICA 12 para esclarecer a influência das variáveis independentes, bem como das interações entre elas, sobre a resposta e descobrir se o modelo matemático foi estatisticamente significativo e se apresentou erro (falta de ajuste). Então, com uma regressão significativa e preditiva, as superfícies de resposta puderam ser obtidas e utilizadas para otimizar o modelo.

3.12.6.2 Efeito da associação entre o coquetel e a Af-XYLA sobre os rendimentos de hidrólise de SEB e SDB

O efeito da ação sinérgica entre a Af-XYLA recombinante de *A. fumigatus* e o coquetel enzimático Celluclast®1.5L foi avaliado durante a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. As reações foram conduzidas em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) contendo 1% (p/v) SEB ou SDB, a 50 °C e 1000 rpm, por 24 ou 48 h. Os valores ótimos para os parâmetros Tween 20 (0,75% (v/v)), Celluclast®1.5L (1,8 FPU g⁻¹), e Af-XYLA (3,75 µg g⁻¹),

que foram previamente estipulados por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), foram utilizados nas misturas reacionais. Os rendimentos percentuais de hidrólise foram determinados estimando-se os açúcares redutores liberados através do método DNS. Os resultados reportados representam as médias $\pm$ desvios padrões calculadas a partir de pelo menos três repetições experimentais.

4 Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UMA ENDO-1,4- β -GLUCANASE GH7 DE *Aspergillus fumigatus* E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Resultados publicados: Bernardi, A. V.; de Gouvêa, P. F.; Gerolamo, L. E.; Yonamine, D. K.; Bálico, L. L. L.; Uyemura, S. A.; Dinamarco, T. M. Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application. *Protein Expression and Purification*, v.150, p.1-11, 2018.

4.1.1 Análises de sequência e estrutura da Af-EGL7

O gene Afu6g01800 de *A. fumigatus* (nomeado *Af-egl7*) possui uma ORF de 1383 pb que codifica uma endo-1,4- β -glucanase (Af-EGL7) com 460 resíduos de aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 48,21 kDa. De acordo com os bancos de dados AspGd (disponível em: <http://www.aspergillusgenome.org/>), CAZy e Uniprot (disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q4WLG5>), a Af-EGL7 é pertencente à família de glicosil hidrolases 7 (GH7) e contém um módulo de ligação a carboidratos nos resíduos 424-460 do C-terminal.

O genoma de *A. fumigatus* contém 2 genes codificantes de endoglucanases GH7 (Afu6g01800 e Afu7g01540) – ambas atuantes através de um mecanismo hidrolítico de retenção e com capacidade de clivar ligações glicosídicas 1,3 e 1,4 (SEGATO *et al.*, 2014). Destas, somente a Af-EGL7 possui um CBM (mais especificamente, um CBM1) associado ao seu domínio catalítico (SEGATO *et al.*, 2014). CBMs são domínios não catalíticos que auxiliam no reconhecimento e ligação das enzimas aos seus respectivos substratos, direcionando-as para próximo do alvo. A presença de um CBM pode promover aumentos nas eficiências catalíticas das enzimas, especialmente tratando-se de substratos insolúveis, como consequência de uma maior concentração enzimática ao redor da superfície-alvo (efeito de proximidade) (SIDAR *et al.*, 2020; BERNARDES *et al.*, 2019; INOUE *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2014a; VÁRNAI *et al.*, 2013; COUTURIER *et al.*, 2011; GUILLÉN *et al.*, 2010).

O alinhamento múltiplo (Figura 9a) da Af-EGL7 com outras endoglucanases GH7 fúngicas revelou uma alta homologia entre as sequências, mais especificamente 95%, 64%, 63%, 63% e 61% de identidade com as enzimas de *N. fischeri* (LIU *et al.*, 2015), *M. thermophila*

(KARNAOURI *et al.*, 2014), *T. reesei* (KLEYWEGT *et al.*, 1997), *T. harzianum* (PELLEGRINI *et al.*, 2015) e *T. emersonii* (WANG *et al.*, 2014), respectivamente.

A estrutura tridimensional da Af-EGL7 foi predita por modelagem por homologia no *software* Phyre2 e manipulada com auxílio do programa Swiss PDB Viewer (Figura 9b). Foi possível observar um sulco aberto e estendido na região do sítio ativo, característico de endoglucanases, no qual uma cadeia de celulose amorfa pode se acomodar aleatoriamente (SEGATO *et al.*, 2014).

Juntos, os resultados permitiram identificar importantes resíduos de aminoácidos conservados entre as endoglucanases GH7 de diferentes espécies. Os dois possíveis resíduos catalíticos, E215 e E220 – um deles atuando como ácido/base e o outro como nucleófilo (SEGATO *et al.*, 2014) – estão destacados em verde na Figura 9b. Foram também identificados 20 resíduos de cisteína (C38, C44, C69, C80, C86, C90, C158, C190, C194, C212, C213, C233, C238, C243, C316, C365, C432, C443, C449 e C459) aptos a formarem 10 pontes dissulfeto (Figura 9c), as quais são fundamentais para o enovelamento correto da proteína e manutenção da estrutura tridimensional de enzimas termoestáveis (LAKBUB *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2017).

Análises no *software* SignalP revelaram um peptídeo sinal nos resíduos 1-20 do N-terminal, indicando que a Af-EGL7 pode ser secretada extracelularmente. Além disso, foram preditos, através do *software* NetNglyc 1.0, 4 potenciais sítios de N-glicosilação nos resíduos de asparagina N96, N201, N205 e N379, os quais estão destacados em vermelho na Figura 9b. Tais sítios são conservados entre endoglucanases GH7 de outras espécies de *Aspergillus*, como *A. fischeri* (ALE19913.1), *A. lentulus* (GAQ03870.1), *A. udagawae* (GAO84310.1), *A. terreus* (XP_001217291.1), *A. clavatus* (XP_001270378.1) e *A. rambellii* (KKK13555.1). A presença de N-glicanos em diferentes sítios da estrutura pode influenciar de diferentes maneiras a proteína, como sua secreção, enovelamento, estabilidade e outras propriedades enzimáticas (WANG *et al.*, 2019b; CHANG *et al.*, 2017).

Figura 9 – Análises de sequência e estrutura da Af-EGL7

a

Af-EGL7	M--D--SKRGVVAVLALLPLVSAQQPAA--SSAGNPKLTTYKCTTAGGCVAQDTSVVLWD	55
<i>T. emersonii</i>	-----MDRILALILVPLATVTAQQIGT-IPEVHPKLPTWKCTTEGGCVQQNTSVVLEY	52
<i>T. reesei</i>	MAPSVTLPL--TTAILAIARLVAAQQPGTSTPEVHPKLTTYKCTKSGGCVAQDTSVVLWD	58
<i>T. harzianum</i>	MALSGPFPLATAALIAFIAQIVAGQQPGTSTPEVHPKLTTYKCTKSGGCVAQDTSVVLWD	60
<i>M. thermophila</i>	MGQK--TLQGLVAAAALAASVANAQQPGTFTPEVHPKLPTWKCTTSGGCVAQDTSVVLWD	58
<i>N. fischeri</i>	M--D--SKRGVVAVLALLPLVSAQQPAT--SSAGNPKLTTYKCTTAGGCVAQDTSVVLWD	55
	: : : : : :	
	& & & & #	
Af-EGL7	GYHWIHTVDG-YTSCITSSGVDSTLCPDAATCAKNCVIEPANYTSAGVTTSGDSLTMYYQY	114
<i>T. emersonii</i>	LSHPITHEVGNSDVSCVVGGLNQLSCPNEEECSKNCVVEGANYTSSGVHTDGDALTNQY	112
<i>T. reesei</i>	NYRWMHDA-N-YNSCTVNGGVNTTLCPEATCGKNCFIEGVDAASGVTTSGSSLTMNQY	116
<i>T. harzianum</i>	NYRWMHDK-N-FNSCTVNGGVNTTLCPEATCGANCFIEGVDAASGVTVSGSSLTMNQY	118
<i>T. thermophila</i>	NYRWFHTEDG-SKSCITSSGVDRTLCPDEATCAKNCFVEGVNYTSSGVETSGSSLTLRQF	117
<i>N. fischeri</i>	GSHWIHTVNG-YTSCITSSGVDSTLCPDEATCAKNCVIEPANYTSAGVATSGDSLTMYYQY	114
	: : * : : * : : : * : : : * : :	
	&	
Af-EGL7	VQ-SNGVYTNASPRLYLLGP---DKNYVMLKLLGQELTFDVLSTLPCGENGALYLSEMS	170
<i>T. emersonii</i>	VTNGD-QVVTASPRVYLLASDDEGNYSMQLLQELGQELSFVDVSKLVCMMNGALYLSEMD	171
<i>T. reesei</i>	MPSSSGGYSSVSPRLYLLDS---DGEYVMLKLLGQELSFVDLSALPCGENGSLYLSQMD	173
<i>T. harzianum</i>	MPSSSGGYSSVSPRLYLLGS---DGDYELLQNLGQELSFVDVLSTLPCGENGALYLSEMA	175
<i>M. thermophila</i>	FKGSDGAINSVSPRVYLLGG---DGNVYVMLKLLGQELSFVDVSLPCGENAALYLSEMD	174
<i>N. fischeri</i>	VQ-MNGVYTNASPRLYLLGP---DKDYVMLKLLGQELSFVDVLSTLPCGENGALYLSEMS	170
	 : : : : : :	
	& & # # &&	
Af-EGL7	ATGGRNEYNTGGAEGSGYCDACQCPVIAWKNGTLNLTSGASYCCNEMDILEANSRANSYTP	230
<i>T. emersonii</i>	ASGGRNSLNPAGAQYSGGYCDACQGVQPFINGTVNTGSLGACCNEMDIWEANALATALTP	231
<i>T. reesei</i>	ENGGANQYNTAGANYSGGYCDACQCPVQWNRNGTLNLTSHQGFCCNEMDILEGNSRANALTP	233
<i>T. harzianum</i>	ANGGANQYNTAGANYSGGYCDACQCPVQWTKNGTLNLTNHSGYCCNEMDILEANSRANAFTTP	235
<i>M. thermophila</i>	ATGGRNEYNTGGAEGSGYCDACQCPVQNNWNGTLNLTGRVGSCCNEMDILEANSKAEAFTP	234
<i>N. fischeri</i>	ASGGRNEYNTGGAEGSGYCDACQCPVIAWKNGTLNLTSGASYCCNEMDILEANSRANSYTP	230
	. * * : : : : : :	
	& &	
Af-EGL7	HPCSAT-----DCDKGGCGFNYPYALGQKSYWGGTVDTSKPFTITTTQFIT	276
<i>T. emersonii</i>	HPCSVTSIYACSGAECGNGVCDKPGCGYNYPYALGDHNYYPGKTVDTSRPFTVVTTQFLT	291
<i>T. reesei</i>	HSCTAT-----ACDSAGCGFNYPYSGYKSYYPGPGDVTDTSKFTTITTTQFNT	279
<i>T. harzianum</i>	HSCTAT-----ACDSAGCGFNYPYANGFQRYWGGTVDTSKPFTITTTQFNT	281
<i>M. thermophila</i>	HPCIGN-----SCDKSGCGFNAYARGYHNYWAPGGTVDTSRPFTTITTTQFNT	280
<i>N. fischeri</i>	HPCSAT-----DCDKGGCGFNYPYALGQKSYWGGTVDTSKPFTITTTQFIT	276
	* * : : : : : :	
	&	
Af-EGL7	NDGTTTGTLSAIRQYMQNGKVIANAVSSTGVNSITEDWCTSVDSAAFTGGLTTMGKAL	336
<i>T. emersonii</i>	NDNTTGTLTLEIRRLYVQDGNVIGPS-PSDSVSSITDSFCSTVDYSYFELGGLKEMGEAL	350
<i>T. reesei</i>	DNGSPSGNLVSIIRKYQQNGVDIPSAQPGG--DTIS--SC---PSASAYGGLATMGKAL	331
<i>T. harzianum</i>	DNGLPSGNLVSITRKYRQNGVDVPSAQSGG--DTIS--SC---PSASAYGGLTTMGKAL	333
<i>M. thermophila</i>	DDGTTSGKLARIERVYVQDGKKVPAAAG--GDVITADGCT---SAQPYGGLSGMGDAL	334
<i>N. fischeri</i>	NDGTTTGTLSAIRQYIQNGKVIANAVSSAGVSSITEDWCTSVDSAAIFGGLTTMGKAL	336
	: . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . : . . :	
	& #	
Af-EGL7	GRGMVLIFSINWDASGFMNWLDSGNAGPCSSTEGNPDLIKAQNPTTHVFSNIRWGDIGS	396
<i>T. emersonii</i>	GRGMVLIFSINWDPGQFMNWLDSGNAGPCNSTEGNPATIEAQHPDTAVTFSNIRWGDIGS	410
<i>T. reesei</i>	SSGMVLIFSINWDNSQYMNWLDSGNAGPCSSTEGNPNILANNPNTTHVFSNIRWGDIGS	391
<i>T. harzianum</i>	ANGMVLIFSINWDNNGNMNWLDSGNAGPCSSTEGNPSTIVANNPNTTHVFSNIRWGDIGS	393
<i>M. thermophila</i>	GRGMVLALSINWDASGYMNWLDSGNAGPCSDTEGNPNILANHPDAHVLSNIRWGDIGS	394
<i>N. fischeri</i>	GRGMVLIFSINWDASGFMNWLDSGNAGPCSSTEGNPDLIKAQNPTTHVFSNIRWGDIGS	396
	. * * * : * * * : : : : :	
	&	
Af-EGL7	TFKSGDSGVTTTT-----STTSTKTTTSTAPGPTQTHYGCGGQGWGTGPTA	442
<i>T. emersonii</i>	TFQS-----	414
<i>T. reesei</i>	TTNSTAPPPPPASSTTFS-----TTRRSSTTSSSPSCTQTHWGCQGGIGYSCKKT	441
<i>T. harzianum</i>	TTGSTGGNPPPTSTRTSTTPPPSTTLRTSTSSRTTSSAAGCTQTHWGCQGGNGYTGCKI	453
<i>M. thermophila</i>	TVDTGDDGNNGGGPN-----P---SSTTATATTTSSGPAEPTQTHYGCGGKGWGTGPTR	446
<i>N. fischeri</i>	TFKSGDDSGTTTTTKT-----TTTKTSTSTSTKTTTSTAPGATQTHYGCGGQGWGTGPTA	451
	*	
	& & &	
Af-EGL7	CASPYTCQVLNPWYSQCL	460
<i>T. emersonii</i>	-----	414
<i>T. reesei</i>	CTSGTTCQYSNDYYSQCL	459
<i>T. harzianum</i>	CTAGTTCQYSNDYYSQCL	471
<i>M. thermophila</i>	CETPYTCKYQNDWYSQCL	464
<i>N. fischeri</i>	CASPYTCKAQNQWYSQCL	469

b

c

a) Alinhamento múltiplo da sequência da Af-EGL7 com as endoglucanases GH7 de *T. emersonii* (KF512472), *T. reesei* (P07981), *T. harzianum* (PMID: 26156238), *M. thermophila* (XM_003663393) e *N. fischeri* (KP861909), realizado com a ferramenta Clustal Omega. As posições com resíduos únicos e totalmente conservados estão indicadas por asteriscos (*). As posições com resíduos altamente similares estão indicadas por dois pontos (:). As posições de resíduos com baixa similaridade estão indicadas por um ponto (.). Os dois possíveis resíduos catalíticos estão destacados em cinza. Os resíduos de cisteína conservados entre as sequências alinhadas estão indicados por &. Os potenciais sítios de N-glicosilação da Af-EGL7 estão indicados por #. b) Estrutura tridimensional da Af-EGL7 (95% dos resíduos modelados com mais de 90% de confiança a partir de estruturas cristalográficas publicadas no banco de dados PDB). Possíveis resíduos catalíticos, potenciais sítios de N-glicosilação e domínio CBM1 estão destacados em verde, vermelho e azul, respectivamente. c) Pontes dissulfeto aptas a serem formadas entre os resíduos de cisteína C38↔C44, C69↔C90, C80↔C86, C158↔C365, C190↔C213, C194↔C212, C233↔C238, C243↔C316, C432↔C449, C443↔C459 destacadas em rosa.

4.1.2 Amplificação e clonagem do gene *Af-egl7*

O gene *Af-egl7* foi amplificado por PCR a partir do cDNA de *A. fumigatus*, conforme a descrição no item 3.3.2 dos Materiais e Métodos. O produto reacional foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), e o resultado pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% após amplificação do gene *Af-egl7* com os *primers* para clonagem em pET-28a(+)

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1: Gene *Af-egl7* amplificado. 2: Controle negativo.

Ao analisar o gel, constatou-se que a banda correspondente ao gene *Af-egl7* amplificado estava em uma posição acima da esperada para o tamanho do mesmo (1383 pb). Essa sutil discrepância pode ser justificada pelo uso do corante GelRed que, por ser uma molécula grande (cerca de 10 vezes maior que brometo de etídio (BrEt)), pode causar atrasos na migração ao se intercalar a amostras de DNA (e RNA) com tamanhos superiores a 400 pb. A banda foi, então, recortada para posterior extração do fragmento amplificado através do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

Posteriormente, o gene *Af-egl7* foi clonado no plasmídeo pGEM[®]-T Easy (item 3.3.4). O produto da reação de ligação foi diretamente transformado em células competentes de *E. coli*

DH10 β . Após o crescimento das células transformadas, realizou-se a PCR das duas únicas colônias brancas da placa para confirmar a presença do inserto no plasmídeo (Figura 11).

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de *E. coli* DH10 β transformadas com o produto da ligação do inserto *Af-egl7* no vetor pGEM[®]-T Easy

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1 e 2: Colônias de *E. coli* DH10 β submetidas a PCR. 3: Controle positivo. 4: Controle negativo.

A análise do gel eletroforético revelou uma banda de aproximadamente 1500 pb (colunas 1 e 2), indicando o sucesso da clonagem e da transformação. Um dos clones positivos foi cultivado em meio LB para posterior extração plasmidial (item 3.3.5). O vetor recombinante *Af-egl7*/pGEM[®]-T Easy foi enviado para sequenciamento e a confirmação da integridade da sequência possibilitou dar continuidade aos experimentos. O resultado desse sequenciamento, bem como de todos os outros realizados, estão apresentados no Apêndice C.

O plasmídeo recombinante foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* e o inserto liberado foi clonado no vetor de expressão pET-28a(+) (previamente digerido com as mesmas enzimas) utilizando-se a enzima DNA ligase (item 3.3.7). O produto da reação de ligação foi transformado em células competentes de *E. coli* Rosetta[™] (DE3) pLysS e, após crescimento por 16 horas em meio LB, os clones positivos foram verificados através de PCR de colônia (Figura 12).

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS transformadas com o produto da ligação do inserto *Af-egl7* no vetor pET-28a(+)

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1 e 2: Colônias de *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS submetidas a PCR. 3: Controle negativo. 4: Controle positivo.

A visualização de duas bandas (colunas 1 e 2) entre 1000 e 1500 pb confirmou a presença do inserto no plasmídeo de expressão. Um dos clones positivos foi selecionado para expressão heteróloga da endoglucanase recombinante *Af*-EGL7.

4.1.3 Expressão heteróloga em *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS, purificação dos corpos de inclusão e zimograma

O gene *Af-egl7* foi clonado em pET-28a(+) e o vetor recombinante *Af-egl7*/pET-28a(+) foi transformado em *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS para expressão heteróloga da endoglucanase *Af*-EGL7 sob o controle do promotor *T7lac*. A indução foi realizada a 37 °C e 200 rpm, com adição de 1 mM de IPTG. Após 4 horas de indução, a proteína recombinante foi obtida intracelularmente, na forma de corpos de inclusão. Procedeu-se com a purificação dos corpos de inclusão e posterior *refolding* da enzima, conforme descrito no item 3.3.10 da seção Materiais e Métodos.

Os extratos celulares obtidos após 0 e 4 h de indução, alguns sobrenadantes coletados durante a purificação, bem como a proteína obtida ao final do processo de *refolding*, foram analisados por SDS-PAGE e estão apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Análise por SDS-PAGE da *Af*-EGL7 após expressão e purificação dos corpos de inclusão

M: Marcador de peso molecular (Precision™ Protein Standards Dual Color – BioRad). 1: Extrato celular obtido após 0 h de indução. 2: Extrato celular obtido após 4 h de indução. 3, 4, 5, 6, 7 e 8: Sobrenadantes obtidos durante a purificação dos corpos de inclusão. 9: *Af*-EGL7 após o *refolding* em tampão C9.

Observou-se uma banda intensa correspondente à *Af*-EGL7 em aproximadamente 52 kDa, valor um pouco acima do peso molecular teórico estimado (48 kDa), o que pode ser justificado pela adição de alguns resíduos de aminoácidos do vetor pET-28a(+) (cauda de histidina na região N-terminal e resíduos de aminoácidos do sítio de clonagem múltipla) à sequência proteica. É importante salientar que, a princípio, pretendia-se purificar a enzima recombinante através de cromatografia de afinidade. Justamente por isso, a *Af*-EGL7 foi expressa em fusão com uma cauda de 6 histidinas. Contudo, devido à sua obtenção na forma de corpos de inclusão, esse tipo de purificação não pôde ser realizado.

Uma vez pura e em sua conformação nativa, a *Af*-EGL7 foi concentrada, resultando em um rendimento final de aproximadamente 5 mg mL⁻¹. Iniciou-se a caracterização da endoglucanase recombinante através de um zimograma, de modo a investigar a habilidade da mesma de hidrolisar os polissacarídeos CMC e β -glucana incorporados em géis de

poliacrilamida. De fato, após corar os géis com Vermelho Congo e, em seguida, descorá-los com NaCl, foi possível observar o aparecimento de bandas de coloração vermelho pálido, correspondentes aos halos de degradação dos substratos (Figura 14).

Figura 14 – Análises de zimograma da *Af*-EGL7

a) Gel SDS-PAGE espelho, corado com Coomassie Brilliant Blue G-250. b) Gel SDS-PAGE contendo 1% (p/v) CMC, corado com Vermelho Congo 0,1% (p/v). c) Gel SDS-PAGE contendo 1% (p/v) β -glucana, corado com Vermelho Congo 0,1% (p/v). M: Marcador de peso molecular (Precision™ Protein Standards Dual Color – BioRad). 1: *Af*-EGL7 recombinante pura.

4.1.4 Caracterização bioquímica e cinética da *Af*-EGL7

4.1.4.1 Determinação das condições reacionais ótimas e estabilidade a diferentes temperaturas e pH

A caracterização bioquímica da *Af*-EGL7 foi realizada conforme descrito no item 3.9. A *Af*-EGL7 mostrou-se mais ativa a 55 °C, porém exibiu 80% da atividade máxima a 60 °C (Figura 15a). Para avaliar a estabilidade térmica da *Af*-EGL7, mediu-se a atividade residual da enzima após incubação durante 30 minutos em uma faixa de temperatura de 30 a 80 °C. Como pode ser observado na Figura 15c, a enzima recombinante manteve-se completamente estável

até 50 °C, mas tornou-se inativa a partir de 60 °C. Ainda com relação à termoestabilidade, determinou-se a atividade enzimática residual da Af-EGL7 após um período maior de incubação nas temperaturas de 50 e 55 °C. Os resultados obtidos estão apresentados no gráfico da Figura 15d e demonstram que, apesar da enzima ter apresentado atividade ótima a 55 °C, a mesma foi muito mais estável a 50 °C, uma vez que reteve 85% de sua atividade após 48 horas de incubação a essa temperatura, enquanto a 55 °C tornou-se inativa após 5 horas. Tais resultados podem ser justificados pela ausência do substrato durante os períodos de pré-incubação, uma vez que a ligação do mesmo ao sítio ativo pode exercer um efeito estabilizador sobre a estrutura da enzima (CHANG *et al.*, 2017; LEJEUNE *et al.*, 2001). Por fim, a Af-EGL7 reteve 100% de sua atividade após ser mantida durante 30 dias a 4 °C na ausência de seu substrato (dados não mostrados).

Ao ser exposta a diferentes valores de pH, a endoglucanase recombinante exibiu sua maior atividade em pH 5,0, mas reteve mais de 55% de sua atividade máxima na faixa de pH 4,0-5,5 (Figura 15b). Além disso, a Af-EGL7 manteve-se completamente estável durante as 24 horas em que foi mantida a 4 °C na ausência de seu substrato na faixa de pH 3,0-6,0, apresentando atividades residuais de 96%, 100%, 100% e 90%, respectivamente (Figura 15e). Contudo, a enzima perdeu 38% de sua atividade em pH 7,0, tornando-se completamente inativa em pH 8,0.

Considerando que as condições ótimas utilizadas nas biorrefinarias durante a sacarificação da celulose são, geralmente, pH 4,5-5,5 e temperatura de 45-50 °C, pode-se inferir que a Af-GL7 apresenta potencial para suplementar coquetéis enzimáticos empregados nessa etapa (ALI *et al.*, 2020; MOHD AZHAR *et al.*, 2017). Ademais, conforme apresentado na Tabela 4, os valores ótimos obtidos para a atividade da Af-EGL7 expressa em *E. coli* são condizentes com os resultados reportados para a maioria das endoglucanases GH7 caracterizadas (pH entre 4,5-5 e temperatura entre 55-60 °C), com exceção das enzimas de *T. emersonii* (Egl7A) e *T. harzianum* (ThCel7B) que apresentaram, respectivamente, temperatura ótima de 70 °C e pH ótimo 3,0 (PELLEGRINI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2014).

Figura 15 – Atividade e estabilidade da Af-EGL7 em diferentes condições reacionais

a) Curva de temperatura. b) Curva de pH. c) Estabilidade térmica. d) Estabilidade a 50 e 55 °C. e) Estabilidade ao pH. As barras de erros representam os desvios padrões (n = 3).

Tabela 4 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes endoglucanases GH7 fúngicas

(continua)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx} (U mg ⁻¹)	K _M (mg mL ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>A. fumigatus</i> Af293	Af-EGL7	<i>P. pastoris</i> X-33	β-Glucana	13722 ± 519	5,6 ± 0,3	11161	1992	55 °C	pH 5,0	100% após 72 h a 55 °C 30% após 1 h a 90 °C	Nenhuma perda após 72 h na faixa de pH 3,0–8,0	BERNARDI <i>et al.</i> , 2019
			Xiloglucana	9082 ± 293	8,6 ± 0,3	7386	859,9					
			CMC-Na	6193 ± 140	24,5 ± 0,6	5037	205,9					
<i>A. fumigatus</i> Af293	Af-EGL7	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	β-Glucana	191,9 ± 0,0007	113,9 ± 0,005	159,9	1,4	55 °C	pH 5,0	85% após 48 h a 50 °C; 40% após 1h a 55 °C	Começou a decair após 24 h em pH 6,0, sendo inativada em pH 8,0	BERNARDI <i>et al.</i> , 2018
			CMC-Na	51,9 ± 0,007	209,7 ± 0,1	43,3	0,2					
<i>N. fischeri</i> P1	Cel7A	<i>P. pastoris</i> GS115	β-Glucana	5000 ± 186	4,5 ± 0,2	-	-	60 °C	pH 5,0	16,1% após 1h a 70 °C	Nenhuma perda após 1 h na faixa de pH 3,0–8,0	LIU <i>et al.</i> , 2015
<i>T. emersonii</i> CBS394.64	Egl7A	<i>P. pastoris</i> GS115	β-Glucana	17951 ± 69	4,0 ± 1,5	-	3156 ± 24	70 °C	pH 4,5	Mais de 50% após 2 min a 80 °C	>70% em pH 1,0-11,0 e 50% em pH 12,0, após 1 h	WANG <i>et al.</i> , 2014
			CMC-Na	2257 ± 79	20,8 ± 2,1	-	78,9 ± 3,8					

Tabela 4 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes endoglucanases GH7 fúngicas

(conclusão)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx} (U mg ⁻¹)	K _M (mg mL ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>M. thermophila</i> ATCC 42464	MtEG7a	<i>P. pastoris</i> X-33	CMC-Na	622,5 ± 86,4	24,0 ± 0,5	-	0,313667	60 °C	pH 5,0	t _{1/2} = 9,96 h (70 °C) t _{1/2} = 6,5 h (80 °C)	Nenhuma perda após 24 h na faixa de pH 3,0– 11,0	KARNAOURI <i>et al.</i> , 2014
<i>T. harzianum</i> IOC-3844	ThCel7B	<i>A. niger</i> PY11	Xiloglucana	0,22 ± 0,095 (μM s ⁻¹)	1,98 ± 0,47	0,45	-	55 °C	pH 3,0	100% após 2 meses de incubação a 55 °C e pH 5,0	-	PELLEGRINI <i>et al.</i> , 2015
<i>C. thermophilum</i>	CTendo7	<i>P. pastoris</i> GS115	CMC-Na	59,6 ± 8,2	79,2 ± 5,8	2,11×10 ⁻³	0,02673	55 °C	pH 5,0	61,3% após 60 min a 80°C Praticamente toda atividade perdida após 100 min a 90°C	-	HUA <i>et al.</i> , 2018
			β-Glucana	12,6 ± 0,6 (μg min ⁻¹ mL ⁻¹)	9,8 ± 0,6	0,7 ×10 ⁻³	0,07849					
<i>Bispora sp.</i> MEY-1	Bgl7A	<i>P. pastoris</i> GS115	β-glucana	6737	9,16	-	-	60 °C	pH 5,0	100% após 1h a 60°C Mais de 30% após 1 h a 70°C	Mais de 85% após 1 h na faixa de pH 1,0– 8,0	LUO <i>et al.</i> , 2010
			CMC-Na	3460	287	-	-					

4.1.4.2 Efeito de diferentes íons e reagentes químicos sobre a atividade da Af-EGL7

As atividades enzimáticas podem ser influenciadas por íons metálicos e outros reagentes químicos que podem estar presentes nos meios reacionais durante os processos industriais, tanto como aditivos ou até mesmo resultantes da corrosão de equipamentos (PEREIRA *et al.*, 2017). Dessa forma, foi importante elucidar o efeito de íons e reagentes sobre a atividade da Af-EGL7 (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito de íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade da Af-EGL7

Aditivo	Atividade Relativa (%)	Aditivo	Atividade Relativa (%)
Nenhum	100,0 ± 0,2	ZnSO ₄	79,6 ± 0,3
MnCl ₂	232,9 ± 3,1	AgNO ₃	0
CoCl ₂	161,1 ± 1,7	DTT	165,2 ± 0,8
CaCl ₂	135,7 ± 0,2	L-cisteína	152,2 ± 1,2
FeSO ₄	128,1 ± 0,9	β-mercaptoetanol	132,1 ± 2,3
MgSO ₄	122,6 ± 4,6	DMSO	111,5 ± 1,7
NiSO ₄	114,2 ± 0,2	EDTA	108,1 ± 0,6
NaCl	113,2 ± 1,4	Tween 20	106,2 ± 0,1
KCl	110,4 ± 0,0	SDS	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	105,5 ± 0,2		

O maior aumento na atividade enzimática da Af-EGL7 foi observado na presença de Mn²⁺ na concentração final de 5 mM (232,9%), o que pode ser justificado pela estabilização da conformação do sítio ativo por esse íon ou ainda pelo aumento da afinidade de ligação do substrato (MELEIRO *et al.*, 2018, KARNCHANATAT *et al.*, 2008). Devido ao estímulo substancial provocado por esse íon sobre a atividade da Af-EGL7, optou-se por investigar seu efeito em outras concentrações no meio reacional (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito de diferentes concentrações de Mn²⁺ sobre a atividade da Af-EGL7

mM	0	0,1	0,5	1	5	10	20
Atividade	100,0 ±	113,4 ±	144,1 ±	174,2 ±	223,9 ±	209,6 ±	73,3 ±
relativa (%)	0,2	1,8	5,9	2,8	1,2	2,8	6,4

Conforme pode ser observado, houve um aumento gradativo na atividade da *Af*-EGL7 à medida que a concentração de Mn^{2+} aumentava, sendo o pico máximo atingido com 5 mM; uma condição de saturação surgiu a partir de 10 mM, quando a atividade relativa começou a decair; em 20 mM, o Mn^{2+} começou a apresentar um efeito inibitório.

As ativações provocadas pelos íons Co^{2+} (161,1%), Ca^{2+} (135,7%), Fe^{2+} (128,1%) e Mg^{2+} (122,6%), e pelo DMSO (111,5%), também podem ser resultados de uma estabilização da estrutura da enzima (AICH *et al.*, 2017; KARNCHANATAT *et al.*, 2008). Esse efeito estimulatório provocado por íons metálicos é relativamente comum entre endoglucanases, mas nenhum mecanismo que o justifique foi proposto até o momento (AICH *et al.*, 2017).

Da mesma forma, também foram observados aumentos na atividade enzimática após a adição de β -mercaptoetanol (132,1%), DTT (165,2%) e L-cisteína (152,2%), sugerindo que grupos sulfidríla de resíduos de cisteína livres (ou seja, que não estão envolvidos em pontes dissulfeto) são importantes para a catálise (MELEIRO *et al.*, 2018; KARNCHANATAT *et al.*, 2008). Por outro lado, observou-se a inibição completa da *Af*-EGL7 após a adição de $AgNO_3$, o que pode ser devido à forte afinidade dos íons Ag^+ (ou outros metais pesados) por grupos sulfidríla reduzidos, que inibe irreversivelmente a atividade enzimática (MELEIRO *et al.*, 2018; NARRA *et al.*, 2014). Por fim, a presença de EDTA (108,1%) no meio reacional não afetou a atividade enzimática, indicando que a *Af*-EGL7 não é uma metaloenzima (MELEIRO *et al.*, 2018).

Os dois surfactantes testados provocaram efeitos opostos sobre a atividade da *Af*-EGL7. Quando exposta ao SDS, um surfactante aniônico, sua atividade enzimática foi completamente inibida. Tal resultado já era esperado, considerando que o SDS é comumente conhecido como um forte desnaturante de proteínas (ZHOU *et al.*, 2011). A presença de Tween 20, por outro lado, não surtiu efeito na atividade da *Af*-EGL7 (106,2%). A tolerância a esses reagentes é uma característica relevante do ponto de vista industrial, uma vez que a utilização de surfactantes não-aniônicos durante a sacarificação da lignocelulose tem demonstrado ser eficaz ao prevenir a adsorção não-produtiva das enzimas à lignina durante a hidrólise (ROCHA-MARTÍN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2009).

4.1.4.3 Avaliação da especificidade da *Af*-EGL7 por diferentes substratos e determinação dos seus parâmetros cinéticos

Endoglucanases pertencentes à família GH7 destacam-se por sua versatilidade catalítica, sendo capazes de atuar sobre uma ampla variedade de substratos (LIU *et al.*, 2015).

De fato, ao investigar a especificidade da Af-EGL7 por diferentes substratos (Tabela 7), observou-se que a mesma é capaz de atuar sobre três polissacarídeos diferentes: CMC, β -glucana e Xiloglucana. A enzima exibiu uma atividade muito superior sobre β -glucana (817,1% quando comparado à atividade sobre CMC), sugerindo que essa enzima corresponde a uma β -1,3-1,4-glucanase e que o alto grau de substituição da cadeia celulósica do CMC com grupos metóxi ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$) pode ter interferido na atividade da Af-EGL7 sobre esse substrato (LIU *et al.*, 2015; KARNAOURI *et al.*, 2014).

O resultado observado condiz com os reportados para outras endoglucanases GH7, incluindo a Bgl7A de *Bispora* sp. MEY-1 (LUO *et al.*, 2010), a Egl7A de *T. emersonii* (WANG *et al.*, 2014), a Cel7A de *N. fischeri* (LIU *et al.*, 2015) e a MtEG7a de *M. thermophila* (KARNAOURI *et al.*, 2014). Por outro lado, apesar da presença de um CBM1 associado ao seu domínio catalítico, a Af-EGL7 não foi ativa sobre Avicel (celulose cristalina), indicando que a mesma não possui atividade de exocelulase (SIDAR *et al.*, 2020; MELEIRO *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2014a; VÁRNAI *et al.*, 2013; HORN *et al.*, 2012; NAIKA *et al.*, 2007). Além disso, apesar de ter sido reportado que a habilidade de degradar xilanas é uma característica comum entre endoglucanases GH7 (HUA *et al.*, 2018; KARNAOURI *et al.*, 2014), a Af-EGL7 não exibiu atividade xilanolítica.

Tabela 7 – Atividades relativas (%) da Af-EGL7 sobre diferentes substratos

Substrato	Atividade relativa (%)
CMC de baixa viscosidade	100,0 $\pm$ 4,7
β -glucana de cevada de média viscosidade	817,1 $\pm$ 1,8
Xiloglucana de semente de tamarindo	334,0 $\pm$ 17,4
Avicel [®] PH-101	ND
Xilana de madeira de faia	ND

ND: Não detectado

Os parâmetros cinéticos da Af-EGL7 foram determinados sobre os substratos CMC e β -glucana. Com β -glucana como substrato, os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ foram 113,9 $\pm$ 0,0046 mg mL⁻¹ e 191,9 $\pm$ 0,0007 U mg⁻¹, respectivamente. Na presença de CMC, por sua vez, os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ foram 209,7 $\pm$ 0,1356 mg mL⁻¹ e 51,98 $\pm$ 0,0069 U mg⁻¹, respectivamente. A eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) da Af-EGL7 foi 6,8 vezes maior sobre β -glucana do que sobre CMC (Tabela 8). Perfis similares foram reportados para outras endoglucanases GH7. A eficiência catalítica da Egl7A de *T. emersonii* foi maior sobre β -glucana (3156 mL mg⁻¹ s⁻¹) do

que sobre CMC ($78,9 \text{ mL mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (WANG *et al.*, 2014). Da mesma forma, a Bgl7A de *Bispora* sp. MEY-1 apresentou maiores afinidade (menor valor de K_M) e $V_{\text{máx}}$ sobre β -glucana ($9,16 \text{ mg mL}^{-1}$ e 6737 U mg^{-1} , respectivamente) em comparação com CMC (287 mg mL^{-1} e 3460 U mg^{-1} , respectivamente) (LUO *et al.*, 2010). Contudo, ao comparar quantitativamente os parâmetros cinéticos, ficou evidente a inferioridade da Af-EGL7 frente a essas enzimas.

Tabela 8 – Parâmetros cinéticos da Af-EGL7 na presença de Mn^{2+} 5 mM

Substrato	K_M (mg mL^{-1})	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{mL mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
CMC	$209,7 \pm 0,1356$	$51,98 \pm 0,0069$	43,32	0,207
β -glucana	$113,9 \pm 0,0046$	$191,9 \pm 0,0007$	159,9	1,404

4.1.5 Desempenho da Af-EGL7 associada ao coquetel Celluclast®1.5L durante a sacarificação de SEB

O bagaço de cana-de-açúcar constitui o principal resíduo agrícola gerado no Brasil e uma promissora fonte de açúcares que podem ser convertidos a etanol e outros bioprodutos (BORIN *et al.*, 2015). Nas biorrefinarias lignocelulósicas, a sacarificação do bagaço pré-tratado é conduzida nas condições de temperatura e pH ótimas do coquetel enzimático, que no caso do Celluclast®1.5L são $50\text{-}60^\circ\text{C}$ e pH $4,5\text{-}6,0$ (dados disponíveis em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/c2730>).

Assim, considerando os valores de pH e temperatura nos quais a Af-EGL7 exibe atividade máxima (pH 5,0 e 55°C), a mesma poderia ser aplicada como suplemento a esse coquetel durante a etapa de hidrólise para melhorar o rendimento de açúcares redutores liberados. Contudo, ainda era necessário avaliar se a Af-EGL7 seria capaz de atuar sinergicamente com as celulasas comerciais de *T. reesei*. Denomina-se sinergia a ação combinada de duas ou mais enzimas que resulta em maior rendimento de produto quando comparado à soma dos rendimentos obtidos com cada enzima individualmente (TOKIN *et al.*, 2020; BARAMEE *et al.*, 2017). Assim como a estabilidade a diversas condições operacionais, a resistência a aditivos e a alta eficiência catalítica, a capacidade de atuar sinergicamente com outras enzimas é uma propriedade fundamental para aplicações biotecnológicas.

Nesse sentido, para avaliar o sinergismo entre a Af-EGL7 e o coquetel Celluclast®1.5L durante a degradação de SEB, as enzimas foram incubadas em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) contendo 1% (p/v) desse substrato e MnCl_2 5 mM (que demonstrou ser um forte

estimulante da atividade da *Af*-EGL7). As reações foram realizadas a 50 °C, sob rotação de 1000 rpm, durante 72 horas. A liberação de açúcares redutores, indicativo da hidrólise do SEB, foi monitorada após 6, 24, 48 e 72 horas e comparada ao controle (coquetel adicionado isoladamente). Conforme apresentado na Figura 16, foram constatados os respectivos aumentos de 140, 98 e 66% na liberação de açúcares após 24, 48 e 72 horas de reação enzimática na presença de ambos coquetel e *Af*-EGL7, em comparação à reação controle. Não foram detectados açúcares redutores após 6 horas. Também não foram detectados açúcares redutores nas reações realizadas somente com a *Af*-EGL7 (dados não mostrados). Esses resultados novamente enfatizam o potencial biotecnológico da *Af*-EGL7, uma vez que essa enzima recombinante foi capaz de atuar sinergicamente com celulases comerciais na degradação de SEB, intensificando a liberação de açúcares redutores a partir dessa biomassa.

Figura 16 – Avaliação do sinergismo entre a *Af*-EGL7 e o coquetel Celluclast®1.5L durante a hidrólise de SEB

Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS e apresentados como percentuais do rendimento máximo teórico. Os dados representam as médias $\pm$ desvios padrões obtidas a partir de 4 réplicas experimentais. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao controle.

A caracterização da *Af*-EGL7 produzida em *E. coli* revelou uma endoglucanase com ótimas propriedades para aplicações biotecnológicas: atividade ótima nas mesmas condições de temperatura e pH utilizadas nas biorrefinarias (pH 5,0 e 55 °C), tolerância a íons metálicos e aditivos químicos, além de sinergia com celulases comerciais durante a degradação de bagaço de cana-de-açúcar. Por outro lado, essa enzima recombinante apresentou termoestabilidade e parâmetros cinéticos inferiores aos da maioria das endoglucanases GH7 fúngicas descritas na literatura. Tal discrepância poderia ser decorrente dos diferentes sistemas de expressão

utilizados: a maioria dessas endoglucanases foram expressas em sistemas eucariotos (sendo a levedura *P. pastoris* o mais utilizado), enquanto a Af-EGL7 foi expressa em bactéria.

Comparado ao sistema procarioto, a expressão heteróloga em *P. pastoris* oferece muitas vantagens, especialmente em termos de processamento, enovelamento e modificações pós-traducionais, as quais são fundamentais para a obtenção das proteínas em suas conformações nativas e biologicamente ativas, afetando de forma considerável as propriedades das mesmas (BHATWA *et al.*, 2021; AKBARZADEH *et al.*, 2018; CHAHED *et al.*, 2018).

A célula de *E. coli* carece de compartimentos subcelulares (como o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi), o que dificulta a realização de modificações pós-traducionais como a glicosilação e a formação de pontes dissulfeto (BHATWA *et al.*, 2021). O citoplasma da *E. coli* constitui um ambiente redutor e, portanto, desfavorável à formação de ligações S-S (GACIARZ *et al.*, 2017; MUKHOPADHYAY *et al.*, 1997). O acúmulo da Af-EGL7 no citoplasma das células na forma de corpos de inclusão foi justamente uma consequência de uma maquinaria de processamento ineficiente e do enovelamento incorreto da enzima (BHATWA *et al.*, 2021).

As análises de bioinformática realizadas anteriormente revelaram 4 potenciais sítios de N-glicosilação na estrutura da Af-EGL7 que, uma vez glicosilados, poderiam ser essenciais para o correto enovelamento da enzima e, portanto, para o desempenho de sua atividade hidrolítica e até mesmo para sua estabilidade (WANG *et al.*, 2019b). Similarmente, a ausência de pontes dissulfeto corretamente formadas na estrutura da Af-EGL7 pode ter influenciado negativa- e significativamente a atividade e a estabilidade enzimática. Assim, considerando todos esses pontos, optou-se por realizar também a expressão heteróloga da Af-EGL7 em *Pichia pastoris*.

4.2 UMA ENDOGLUCANASE GH7 TERMOESTÁVEL DE *Aspergillus fumigatus*, SUPEREXPRESSA EM *Pichia pastoris*, ESTIMULA A HIDRÓLISE DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

Resultados publicados: Bernardi, A. V.; Yonamine, D. K.; Uyemura, S. A.; Dinamarco, T. M. A Thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 Endoglucanase Over-Expressed in *Pichia pastoris* Stimulates Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(9):2261, 2019.

4.2.1 Amplificação e clonagem do gene *Af-egl7*

O gene *Af-egl7* (sem os nucleotídeos que codificam o peptídeo sinal e sem o códon de parada) foi amplificado por PCR a partir do cDNA de *A. fumigatus*, conforme a descrição no item 3.4.2 dos Materiais e Métodos. A remoção do peptídeo sinal foi realizada visando à expressão extracelular da endoglucanase recombinante. Mesmo que, em alguns casos, peptídeos sinais nativos tenham sido utilizados com sucesso na secreção das proteínas de interesse, na maioria das vezes a *P. pastoris* não é capaz de utilizá-los de forma eficiente (CREGG *et al.*, 1993). Desse modo, optou-se por utilizar o sinal de secreção fator α (da levedura *S. cerevisiae*) presente no vetor pPICZ α A.

Após a reação de PCR, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), conforme pode ser observado na Figura 17.

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose 1% após amplificação do gene *Af-egl7* com os *primers* para clonagem em pPICZ α A

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1: Controle negativo. 2-6: Gene *Af-egl7* amplificado.

Foi possível visualizar as bandas correspondentes ao gene da endoglucanase (1383 pb) entre 1000 e 1500 pb, nas colunas 2, 3, 4, 5 e 6. As 5 bandas foram recortadas para posterior extração dos fragmentos amplificados. Posteriormente, realizou-se a clonagem do inserto *Af-egl7* no vetor pPICZ α A (previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*) através do método CPEC (item 3.4.3). Essa metodologia de clonagem utiliza o mecanismo de

extensão da DNA polimerase para unir fragmentos de DNA que se sobrepõem, formando um plasmídeo (QUAN & TIAN, 2011). Após a reação de CPEC, o produto reacional foi diretamente transformado em *E. coli* DH10 β quimiocompetente. Após 16 horas de crescimento a 37 °C, procedeu-se com a PCR das colônias crescidas na placa para averiguar quais eram efetivamente positivas (Figura 18).

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de *E. coli* DH10 β transformadas com o produto da clonagem do inserto *Af-egl7* no vetor pPICZ α A por CPEC

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1-9: Colônias de *E. coli* DH10 β submetidas a PCR. 10: Controle positivo. 11: Controle negativo.

Dentre os 9 clones testados, 4 foram positivos (colunas 1, 2, 3 e 8), conforme evidenciado pelas bandas em aproximadamente 1500 pb. Um dos clones foi selecionado para sequenciamento, de modo a verificar a integridade da sequência (ausência de mutações) e se a mesma foi inserida no vetor “in frame” com o peptídeo sinal fator α .

Em seguida, o vetor *Af-egl7/pPICZ α A* foi linearizado com a enzima de restrição *PmeI* para permitir a integração, por adição, do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* X-33 através de recombinação homóloga no locus AOX1. Prosseguiu-se com a transformação do plasmídeo recombinante linearizado em células eletrocompetentes de *P. pastoris* X-33. Após 3 dias de crescimento a 30 °C, foi realizado um *screening* dos clones recombinantes de *P. pastoris* através de um teste de atividade enzimática em placa. Para tanto, 24 colônias crescidas na placa de transformação foram repicadas em meio sólido YPD contendo CMC como substrato (1% p/v), além de metanol (1% v/v) para indução da expressão gênica. As placas permaneceram na estufa a 30 °C por 3 dias, após esse período foram coradas com Vermelho Congo e, em seguida, descoradas com NaCl até o aparecimento de zonas com coloração mais clara, como pode ser

observado na Figura 19. O surgimento de halos de degradação maiores que o do controle ao redor de todas as colônias, com exceção do clone 4, indicaram que 23 clones de *P. pastoris* estavam expressando a Af-EGL7 de forma funcional.

Figura 19 – Resultado do teste de atividade enzimática realizado em placa de Petri para 24 colônias de *P. pastoris* X-33 transformadas com o vetor recombinante *Af-egl7*/pPICZ α A

Os 24 clones resultantes da transformação com o vetor recombinante e o controle (ct, *P. pastoris* transformada com o vetor pPICZ α A vazio) foram repicados em meio sólido YPD contendo 1% (p/v) de CMC e 1% (v/v) de metanol para indução da expressão gênica. Após 3 dias de incubação em estufa a 30 °C, as placas foram coradas com Vermelho Congo 0,1% (p/v) e, posteriormente, descoradas com NaCl 1 M até o aparecimento dos halos de degradação.

4.2.2 Expressão heteróloga em *P. pastoris* X-33, purificação da enzima recombinante e deglicosilação

O gene *Af-egl7* foi clonado no vetor pPICZ α A e expresso em *P. pastoris* X-33 sob o controle do promotor AOX1, induzível por metanol. Uma vez que o gene *Af-egl7* foi clonado “in frame” com o peptídeo sinal fator α de levedura, a endoglucanase recombinante pôde ser obtida extracelularmente. Ademais, a Af-EGL7 foi expressa fusionada a uma cauda de histidina na região C-terminal. Desse modo, finalizados os 6 dias de indução com metanol 1,5% (v/v), o sobrenadante da cultura foi separado por centrifugação, concentrado em filtro para centrífuga Amicon Ultra-15 com limite de corte de 10 kDa, e, por fim, submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna contendo resina imobilizada com níquel (Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare)). Todas as frações coletadas durante a purificação da Af-EGL7 foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 20a).

Figura 20 – Análises por SDS-PAGE da *Af*-EGL7 após a) purificação e b) deglicosilação

a) Purificação da *Af*-EGL7 recombinante. M: Marcador de peso molecular (Precision™ Plus Protein Standards Dual Color – BioRad). 1: *Flow-through*. 2-6: Lavagem com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo NaCl 500 mM (pH 7,4). 7-16: Eluição da *Af*-EGL7 com 5, 10, 20, 40 (1), 40 (2), 80 (1), 80 (2), 160, 250 e 500 mM de imidazol, respectivamente. b) Deglicosilação da *Af*-EGL7. M: Marcador de peso molecular. 1: *Af*-EGL7 não-tratada. 2 e 3: *Af*-EGL7 após tratamento com Endo-H sob condições não-desnaturante e desnaturante, respectivamente.

Conforme pode ser visualizado no gel, a *Af*-EGL7 começou a ser eluída em quantidade relevante a partir de uma concentração de 20 mM de imidazol, mas a partir de 80 mM a enzima pôde ser obtida com maior grau de pureza. As frações contendo a endoglucanase recombinante pura foram misturadas e submetidas à troca de tampão para remoção do imidazol. Por fim, a quantificação da *Af*-EGL7 pura pelo método de Greenberg revelou um rendimento proteico de cerca de 450 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Observou-se que a endoglucanase recombinante migrou como uma banda de peso molecular aproximado de 70 kDa (Figura 20a). Contudo, o peso molecular teórico estimado

para essa proteína foi equivalente a 48 kDa. Essa discrepância poderia ser justificada pela presença de N-glicanos na estrutura da Af-EGL7: de fato, análises de bioinformática previamente realizadas revelaram a presença de 4 potenciais sítios de N-glicosilação (N96, N201, N205 e N379) na sequência da endoglucanase recombinante.

Assim, de modo a averiguar se houve N-glicosilação e se essa modificação pós-traducional estaria influenciando o peso molecular da enzima, realizou-se a deglicosilação da Af-EGL7 (Figura 20b). Após comparar as migrações eletroforéticas da enzima tratada e não-tratada com Endo-H, observou-se uma redução no peso molecular para aproximadamente 60 kDa. Entretanto, a enzima N-deglicosilada continuou apresentando um peso molecular acima do esperado, o que pode ser devido a outras modificações pós-traducionais, como O-glicosilação (comumente observada em endoglucanases GH7) ou hiperglicosilação (comum em proteínas heterólogas produzidas por *P. pastoris*) (AMORE *et al.*, 2017; HAMILTON & GERNGROSS, 2007).

4.2.3 Caracterização bioquímica e cinética da Af-EGL7 produzida em *P. pastoris*

4.2.3.1 Ensaio de estabilidade a diferentes temperaturas e pH

A glicosilação tem sido reportada como uma modificação pós-traducional que pode atribuir às CAZymes (e outras enzimas) maior proteção contra proteólise e termoestabilidade durante processos naturais e industriais, podendo impactar até mesmo a atividade e a ligação ao substrato (CHUNG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019b; AMORE *et al.*, 2017; RUBIO *et al.*, 2016; MELDGAARD & SVENDSEN, 1994). Nesse sentido, considerando que a Af-EGL7 foi agora expressa no hospedeiro eucarioto *P. pastoris*, avaliou-se novamente sua estabilidade a diferentes condições de temperatura e pH e comparou-se os resultados com aqueles obtidos quando a enzima foi expressa em *E. coli*.

A termoestabilidade da Af-EGL7 foi avaliada através da pré-incubação da enzima, na ausência do substrato, em temperaturas variando de 55 a 90 °C por até 72 horas (Figura 21a). A enzima recombinante mostrou-se altamente estável a 55 °C, retendo 100% de sua atividade inicial após 72 horas de pré-incubação em sua temperatura ótima. Ainda, após ser mantida a 60 °C durante 24, 48 e 72 horas, a Af-EGL7 exibiu atividades residuais de 61, 45 e 29%, respectivamente. A enzima foi resistente mesmo após ser submetida a temperaturas mais extremas, apresentando atividades residuais de cerca de 75, 60 e 30% após 1 hora a 70, 80 e 90 °C, respectivamente. Tal resultado evidencia a importância de um correto processamento e

enovelamento da enzima para suas propriedades (CHAHED *et al.*, 2018; AKBARZADEH *et al.*, 2014), uma vez que após somente 30 minutos de pré-incubação a 55 °C, a Af-EGL7 expressa em *E. coli* perdeu metade de sua atividade inicial e, após esse mesmo tempo a temperaturas maiores (60, 70 e 80 °C), foi completamente inativada.

A termoestabilidade exibida pela Af-EGL7 foi equiparável às de endoglucanases GH7 de fungos termofílicos: a enzima CTendo7 de *C. thermophilum* (HUA *et al.*, 2018), assim como a Af-EGL7, apresentou uma atividade residual de aproximadamente 60% após 1 hora de incubação a 80 °C (Tabela 4). Além disso, a comparação com as estabilidades térmicas reportadas para a Cel7A (LIU *et al.*, 2015), Bgl7A (LUO *et al.*, 2010) e Egl7A (WANG *et al.*, 2014) dos respectivos fungos *N. fischeri*, *Bispora* sp. MEY-1 e *T. emersonii*, evidenciou a superioridade da Af-EGL7 nesse quesito: após 1 hora a 70 °C, as enzimas Cel7A, Bgl7A e Egl7A exibiram somente 16, 30 e 40% de atividades residuais, respectivamente. Somente a MtEG7a, do termófilo *M. thermophila*, superou a Af-EGL7, exibindo $t_{1/2}$ de 9,96 h (70 °C) e 6,5 h (80 °C) (KARNAOURI *et al.*, 2014).

Além da glicosilação, outro fator que pode ter contribuído consideravelmente para a notável resistência térmica da Af-EGL7 expressa em *P. pastoris* são as pontes dissulfeto. Análises estruturais realizadas anteriormente revelaram 10 pontes dissulfeto com potencial para serem formadas, algumas delas localizadas próximas às extremidades N- e C-terminal. De fato, a presença de pontes dissulfeto, especialmente no N- ou C-terminal ou, ainda, em regiões de α -hélice, já foi reportada como um dos principais fatores responsáveis pela maior estabilidade térmica das enzimas (FAN *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2019b; TAKITA *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2018a).

Dadas as inúmeras vantagens de se realizar processos industriais em temperaturas acima de 50 °C, a termoestabilidade é uma das propriedades enzimáticas mais desejáveis para aplicações biotecnológicas (MIAO *et al.*, 2018; CHAHED *et al.*, 2018; MOROZ *et al.*, 2015). O pré-tratamento a vapor tem sido o método mais frequentemente utilizado em biorrefinarias para aumentar a digestibilidade da biomassa para a etapa de sacarificação enzimática. Nesse contexto, o uso de enzimas termoestáveis é muito mais vantajoso, uma vez que as mesmas podem ser usadas diretamente após esse processo, sem a necessidade de arrefecimento prévio, economizando principalmente tempo e energia (AZIZI *et al.*, 2015; KARNAOURI *et al.*, 2014; BRODEUR *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2009).

Considerando as inúmeras possibilidades de aplicações industriais das celulasas, uma ênfase considerável também tem sido direcionada à obtenção de enzimas que são estáveis em uma ampla gama de valores de pH (YAN *et al.*, 2016; SRIVASTAVA *et al.*, 2015;

KARNAOURI *et al.*, 2014). Por exemplo, celulases estáveis a condições alcalinas podem ser utilizadas como aditivos de detergentes para roupas e em processos de biopolimento de tecidos de algodão, em industriais têxteis (KARNAOURI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2012); aquelas estáveis em condições moderadas (pH 5,0–6,0) podem ser aplicadas em processos de fabricação de cerveja e biocombustíveis (MOHD AZHAR *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2012; KUHAD *et al.*, 2011); por fim, as enzimas acidofílicas e tolerantes a ambientes mais ácidos são mais favoráveis à aplicação em processos de destintamento de papéis (KUHAD *et al.*, 2011).

Nesse sentido, investigou-se a estabilidade da Af-EGL7 em uma faixa de pH variando de 3,0 a 8,0 (Figura 21b). A endoglucanase recombinante foi notavelmente estável em todas as condições de pH a que foi submetida, retendo 100% de atividade mesmo após 72 horas. Novamente os resultados obtidos após a expressão da Af-EGL7 em *P. pastoris* foram muito superiores comparados aos obtidos para a enzima produzida em bactéria, que foi totalmente inativada em pH igual ou superior a 7 após 24 horas de pré-incubação.

Figura 21 – Estabilidade da Af-EGL7

a) Estabilidade térmica a diferentes temperaturas. b) Estabilidade ao pH. As barras de erros representam os desvios padrões ($n = 3$).

4.2.3.2 Efeito de produtos reacionais e de diferentes concentrações de Cu^{2+} sobre a atividade da Af-EGL7

Além da estabilidade térmica e ao pH, a tolerância à inibição por produto também é uma característica de extrema relevância no âmbito industrial. O acúmulo de celobiose e glicose (produtos finais da despolimerização da celulose) no hidrolisado pode afetar negativamente a eficiência catalítica das enzimas, sendo um dos fatores que mais limitam a hidrólise da biomassa e contribuem para os baixos rendimentos e altos custos do processo (MELEIRO *et al.*, 2018; TEUGJAS & VÄLJAMÄE, 2013; PEI *et al.*, 2012; ANDRIĆ *et al.*, 2010; GRUNO *et al.*, 2004). Nesse sentido, avaliou-se a atividade da Af-EGL7 sobre xiloglucana na presença de concentrações crescentes desses dois açúcares.

O uso do substrato cromogênico Azo-Xyloglucan ao invés do clássico CMC foi devido ao fato de que ambas glicose e celobiose possuem extremidades redutoras e, portanto, iriam interferir na detecção dos açúcares redutores provenientes da degradação do substrato pelo método DNS. Além disso, já foi demonstrado, através dos ensaios de especificidade, que a Af-EGL7 exibe alta atividade catalítica sobre xiloglucana, o que foi confirmado através da determinação dos seus parâmetros cinéticos sobre esse polissacarídeo (resultados mostrados mais adiante).

Foi possível observar que a adição de glicose, além de não afetar negativamente a Af-EGL7, estimulou a atividade da enzima em concentrações acima de 25 mM (Figura 22). Com relação à celobiose, por sua vez, foram observadas perdas de aproximadamente 14, 23 e 35% da atividade inicial na presença de 10, 25 e 50 mM desse dissacarídeo, respectivamente. Resultados similares foram reportados para a endoglucanase GH5 de *S. thermophilum* (Egst): a presença de glicose no meio reacional em concentração de 30 mM estimulou a atividade da enzima em 1,6 vezes, enquanto celobiose 50 mM provocou uma inibição de aproximadamente 33% (MELEIRO *et al.*, 2018).

Figura 22 – Efeito de glicose e celobiose sobre a atividade da Af-EGL7

As barras de erros representam os desvios padrões (n = 3).

Considerando a ação sinérgica entre endoglucanases e LPMOs durante a hidrólise da celulose (RANI SINGHANIA *et al.*, 2021; VELASCO *et al.*, 2021; TOKIN *et al.*, 2020; VALENZUELA *et al.*, 2019), seria importante avaliar a tolerância da Af-EGL7 à presença de cobre no meio reacional. Esse cátion bivalente é cofator das LPMOs e, portanto, essencial para a atividade dessas enzimas acessórias (RANI SINGHANIA *et al.*, 2021; VELASCO *et al.*,

2021). Brevemente, o mecanismo oxidativo de clivagem das ligações glicosídicas pelas LPMOs envolve a redução do Cu^{2+} coordenado ao sítio ativo por uma molécula redutora, que pode ser a enzima celobiose desidrogenase ou uma molécula como o ácido ascórbico (OGUNYEWU *et al.*, 2020).

Como pode ser observado na Tabela 9, a endoglucanase recombinante teve sua atividade estimulada por esse íon em concentrações de 0,1 a 1 mM. Mesmo na presença de 5, 10 e 15 mM de Cu^{2+} , a enzima apresentou, respectivamente, cerca de 86, 50 e 22% de atividade relativa. A adição de 5 mM de ácido ascórbico não afetou a atividade da Af-EGL7 (dados não mostrados). Tais resultados sugerem que a associação da Af-EGL7 com LPMOs em um coquetel enzimático é possível e poderá reduzir significativamente a quantidade de enzimas necessárias para atingir bons rendimentos.

Tabela 9 – Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} sobre a atividade da Af-EGL7	
Concentração de Cu^{2+} (mM)	Atividade relativa (%)
0	100,0 $\pm$ 1,7
0,1	107,2 $\pm$ 1,4
0,5	115,5 $\pm$ 0,5
1	117,4 $\pm$ 0,7
5	85,9 $\pm$ 1,5
10	49,8 $\pm$ 1,5
15	21,7 $\pm$ 0,3

4.2.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos da Af-EGL7

Os parâmetros cinéticos da Af-EGL7 expressa em *P. pastoris* foram determinados sobre CMC, β -glucana e Xiloglucana (Tabela 10). Observou-se que a Af-EGL7 recombinante exibiu maior atividade sobre os substratos β -glucana e Xiloglucana do que sobre CMC, o que corroborou os resultados obtidos anteriormente nos ensaios de especificidade. Novamente, é importante reforçar que esse mesmo perfil foi reportado para a maioria das endoglucanases GH7 fúngicas já descritas, e indica a habilidade da Af-EGL7 de atuar sobre ambas ligações glicosídicas 1,3 e 1,4. Além disso, conforme já foi mencionado, esse desempenho inferior sobre CMC pode ser devido à interferência dos grupos metóxi na atividade da enzima (LIU *et al.*, 2015).

Contrastando novamente os resultados obtidos quando a *Af*-EGL7 foi expressa em *E. coli*, os valores de $V_{\text{máx}}$ da endoglucanase recombinante produzida em *P. pastoris* foram superiores aos da maioria das endoglucanases GH7 de fungos já descritas. Por exemplo, quando β -glucana foi utilizada como substrato, a Cel7A de *N. fischeri* (LIU *et al.*, 2015) e a Bgl7A de *Bispora* sp. MEY-1 (LUO *et al.*, 2010) apresentaram valores de $V_{\text{máx}}$ equivalentes a 5000 e 6737 U mg^{-1} , respectivamente. O valor de $V_{\text{máx}}$ determinado para a Bgl7A sobre CMC também foi inferior, equivalente a 3460 U mg^{-1} . Similarmente, as $V_{\text{máx}}$ exibidas pelas enzimas Egl7A de *T. emersonii* (WANG *et al.*, 2014) e MtEg7A de *M. thermophila* (KARNAOURI *et al.*, 2014) sobre CMC foram inferiores à da *Af*-EGL7: 2257 ± 79 e $622,5 \pm 86,4$ U mg^{-1} , respectivamente. Por outro lado, a Egl7A superou a *Af*-EGL7 em termos de eficiência catalítica sobre β -glucana, exibindo um valor de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ equivalente a 3156 $\text{mL mg}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Além disso, os parâmetros cinéticos determinados para a *Af*-EGL7 expressa em levedura foram muito superiores àqueles obtidos quando a mesma foi expressa em *E. coli*, o que demonstra a grande influência do processamento correto da enzima sobre sua atividade. Mais especificamente, as eficiências catalíticas calculadas para a enzima expressa em *P. pastoris* sobre CMC e β -glucana foram, aproximadamente, 1000 e 1400 vezes superiores, respectivamente.

Tabela 10 – Parâmetros cinéticos obtidos para a *Af*-EGL7 expressa em *Pichia pastoris* sobre os substratos CMC, β -glucana e Xiloglucana

Substrato	K_{M} (mg mL^{-1})	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{mL mg}^{-1} \text{s}^{-1}$)
CMC	$24,5 \pm 0,6$	6193 ± 140	5037	205,9
β -glucana	$5,6 \pm 0,3$	13722 ± 519	11161	1992
Xiloglucana	$8,6 \pm 0,3$	9082 ± 293	7386	859,9

4.2.4 Desempenho da *Af*-EGL7 associada ao coquetel Celluclast®1.5L durante a sacarificação de diferentes biomassas lignocelulósicas

Todas as propriedades investigadas até o momento (termoestabilidade, estabilidade ao pH e eficiência catalítica) apontaram a superioridade da *Af*-EGL7 expressa em *P. pastoris* frente à enzima produzida em *E. coli*. Desse modo, seria importante verificar se a ação sinérgica entre a endoglucanase recombinante, agora produzida em um sistema eucarioto, e o coquetel enzimático comercial promoveria melhores resultados. Além disso, investigou-se o sinergismo entre as celulasas sobre outros substratos lignocelulósicos além do SEB.

Os meios reacionais consistiram em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) contendo 1% (p/v) de um dos seguintes resíduos agrícolas: SEB, bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, palha de arroz, palha de feijão, sabugo de milho ou bagaço de cevada. As quantidades de enzimas utilizadas foram 10 µg de *Af*-EGL7 (1 mg g⁻¹ de substrato) e 0,009 FPU de coquetel (0,9 FPU g⁻¹ de substrato). As reações foram conduzidas a 55° C e 1000 rpm por até 72 horas. A liberação de açúcares redutores foi monitorada a cada 24 horas e comparada ao controle (coquetel adicionado isoladamente). Os resultados revelaram um elevado grau de sinergismo entre a *Af*-EGL7 e as celulases comerciais durante a degradação de todas as biomassas, com exceção do bagaço de cevada (Figura 23).

A suplementação com a *Af*-EGL7 intensificou de forma mais expressiva a degradação de Sabugo de milho e Palha de arroz, aumentando a liberação de açúcares redutores em 128% e 80%, respectivamente, após 72 horas de reação. Os aumentos promovidos na degradação de bagaço “in natura”, SEB e palha de feijão foram de 31%, 45% e 42%, respectivamente, após 72 horas de reação. As composições de cada uma dessas biomassas, em termos de percentual de celulose, hemicelulose e lignina, estão apresentadas na Tabela 11.

Ao comparar os dois gráficos de liberação de açúcares a partir de SEB (Figura 23b e Figura 16) ficou novamente evidenciada a superioridade da enzima expressa em *P. pastoris*: 12,4% de açúcares redutores foram liberados após 72 horas de hidrólise com as celulases comerciais e a *Af*-EGL7 produzida em bactéria; uma quantidade 50 vezes menor da *Af*-EGL7 expressa em levedura foi capaz de promover, juntamente com o coquetel, uma liberação de quase metade desse percentual (equivalente a 5,4%); em ambos os casos, a quantidade de Celluclast®1.5L utilizada foi a mesma.

Figura 23 – Avaliação do sinergismo entre a *Af-EGL7* e o coquetel Celluclast® 1.5L durante a hidrólise de diferentes resíduos agrícolas

Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS e apresentados como percentuais do rendimento máximo teórico. As barras brancas e pretas correspondem, respectivamente, ao controle (coquetel isolado) e à associação entre coquetel e *Af-EGL7*. Os dados representam as médias $\pm$ desvios padrões obtidas a partir de 4 réplicas experimentais. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao controle.

Tabela 11 – Composição lignocelulósica de diferentes resíduos agroindustriais

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar “in natura”	42,0	25,0	20,0	KIM & DAY, 2011
SEB	47,5	9,0	34,3	de GOUVÊA <i>et al.</i> , 2018
Palha de arroz	32,1	24,0	18,0	PRASAD <i>et al.</i> , 2007
Sabugo de milho	45,0	35,0	15,0	PRASAD <i>et al.</i> , 2007
Bagaço de cevada	12,3	23,4	26,1	MELLO & MALI, 2014
Palha de feijão	43,7	28,0	8,4	BRUM <i>et al.</i> , 2012

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA AfCel6A

Resultados publicados: Bernardi, A. V.; Gerolamo, L. E.; de Gouvêa, P. F.; Yonamine, D. K.; Pereira, L. M. S.; de Oliveira, A. H. C.; Uyemura, S. A.; Dinamarco, T. M. LPMO AfAA9_B and Cellobiohydrolase AfCel6A from *A. fumigatus* Boost Enzymatic Saccharification Activity of Cellulase Cocktail. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 276, 2021.

4.3.1 Análises de sequência e estrutura da AfCel6A

O gene Afu3g01910 de *A. fumigatus* (nomeado *Afcel6A* por CHRISTENSEN *et al.* (2019)) possui uma ORF de 1365 pb que codifica uma celobiohidrolase GH6 (AfCel6A) com 454 resíduos de aminoácidos e um peso molecular teórico de 47,8 kDa (<http://www.aspergillusgenome.org/>; <https://www.uniprot.org/uniprot/Q4WLG5>). Celobiohidrolases produzidas por espécies de *Aspergillus* podem ou não apresentar um CBM associado ao seu domínio catalítico, e encontram-se distribuídas entre as famílias 6 e 7 das glicosil hidrolases. No caso do genoma de *A. fumigatus* Af293, estão presentes 2 genes codificantes de celobiohidrolases GH7 (Afu6g07070 e Afu6g11610) e somente um que codifica uma celobiohidrolase GH6 (Afu3g01910). Destes, somente o Afu6g07070 codifica uma enzima sem módulo de ligação a carboidratos (SEGATO *et al.*, 2014). Celobiohidrolases GH6 se

distinguem das GH7 por catalisarem a liberação de moléculas de celobiose a partir das extremidades não-redutoras das cadeias e por seu mecanismo de inversão, comum a todos os membros dessa família (LOMBARD *et al.*, 2014; VUONG & WILSON, 2009).

A estrutura da AfCel6A é formada por um domínio catalítico conectado, através de um peptídeo flexível altamente O-glicosilado, a um módulo de ligação à celulose (CBM1) nos resíduos 20-55 do N-terminal (REDDY DODDA *et al.*, 2016; <https://www.uniprot.org/uniprot/Q4WFK4>). Análises da sequência da AfCel6A realizadas nos *softwares* SignalP e NetNGlyc 1.0 revelaram, respectivamente, um peptídeo sinal nos resíduos 1-19 do N-terminal e um potencial sítio de N-glicosilação no resíduo de asparagina N413. Esse peptídeo sinal foi removido antes da clonagem do gene *Afcel6A* “in frame” com a sequência do peptídeo sinal fator α (da levedura *S. cerevisiae*) presente no vetor pPICZ α A – um passo essencial para a obtenção de uma enzima recombinante extracelular.

As análises estruturais de uma celobiohidrolase GH6 proveniente de outra cepa de *A. fumigatus* (NITDGPKA3), a qual compartilha mais de 99% de similaridade com a sequência da AfCel6A, já haviam sido realizadas por Reddy Dodda *et al.* (2016). Os autores obtiveram a estrutura tridimensional dessa enzima (Figura 24) através de modelagem por homologia, a qual foi realizada utilizando-se o módulo Modeller da plataforma Discovery Studio (Accelrys). Obteve-se um modelo composto por 13 α -hélices e 7 folhas β unidas por 13 voltas, a partir do qual foi possível visualizar com clareza os dois domínios estruturais (domínio catalítico e o CBM1). Observou-se um sítio ativo em forma de túnel, comum a todas as celobiohidrolases e característico da atividade processiva dessas enzimas (REDDY DODDA *et al.*, 2016; VARROT *et al.*, 1999). Quatro pontes dissulfeto estão presentes na estrutura nativa da AfCel6A – C27 $\leftrightarrow$ C44, C38 $\leftrightarrow$ C54, C185 $\leftrightarrow$ C244, C376 $\leftrightarrow$ C423 – estando as duas últimas localizadas próximas ao sítio ativo (REDDY DODDA *et al.*, 2016; <https://www.uniprot.org/uniprot/Q4WFK4>).

Para todas as celobiohidrolases GH6, estão descritos dois resíduos de aspartato envolvidos na atividade catalítica das enzimas (LIU *et al.*, 2010; VUONG & WILSON, 2009). No caso da AfCel6A, os potenciais resíduos catalíticos foram preditos como sendo D230 (doador de prótons) e D409 (nucleófilo) (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q4WFK4>).

Figura 24 – Estrutura tridimensional da AfCel6A

Estrutura obtida por modelagem por homologia a partir da estrutura cristalográfica da celobiohidrolase Cel6A de *Chaetomium thermophilum* (PDB: 4A05) (72% de identidade de sequência e 79% de cobertura). Fonte: REDDY DODDA *et al.*, 2016.

4.3.2 Amplificação e clonagem do gene *Afcel6A*

O gene *Afcel6A* (sem os nucleotídeos que codificam o peptídeo sinal e sem o códon de parada) foi amplificado por PCR a partir do cDNA de *A. fumigatus* e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (Figura 25).

Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose 1% após amplificação do gene *Afccl6A* com os *primers* para clonagem em pPICZαA

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1-6: Gene *Afccl6A* amplificado. 7: Controle positivo. 8: Controle negativo.

Foram observadas bandas correspondentes ao gene da celobiohidrolase (1365 pb) amplificado a partir do cDNA entre 1000 e 1500 pb, nas colunas 1, 2, 3, 4, 5, e 6. A banda em uma posição superior às demais, na coluna 7, corresponde ao controle positivo da reação de PCR, para o qual utilizou-se DNAg de *A. fumigatus* como molde. Essa diferença nos tamanhos decorre da presença de *íntrons* no DNA genômico, que adiciona 348 pb à ORF do gene *Afccl6A* (resultando em 1713 pb).

Após recortar as 6 bandas e extrair o fragmento amplificado a partir do cDNA, prosseguiu-se com a clonagem do inserto *Afccl6A* no vetor pPICZαA (previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*) através do método CPEC (item 3.4.3). Após a reação, o produto foi diretamente transformado em *E. coli* DH10β quimiocompetente. Após 16 horas de crescimento a 37 °C, realizou-se PCR das colônias crescidas na placa para averiguar quais eram efetivamente positivas (Figura 26).

Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de *E. coli* DH10 β transformadas com o produto da clonagem do inserto *Afcel6A* no vetor pPICZ α A por CPEC

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1-18: Colônias de *E. coli* DH10 β submetidas a PCR. 19: Controle negativo. 20: Controle positivo.

As bandas visualizadas entre 1000 e 1500 pb revelaram que dos 18 clones testados (colunas 1-18), 12 eram positivos. Um dos clones positivos foi enviado para sequenciamento. Uma vez constatada a ausência de mutações e a clonagem da sequência “in frame” com o peptídeo sinal fator α , o vetor recombinante *Afcel6A*/pPICZ α A foi linearizado com a enzima de restrição *Pme*I e transformado em células eletrocompetentes de *P. pastoris* X-33. Após 3 dias de crescimento a 30 °C, realizou-se um *screening* dos clones recombinantes de *P. pastoris* através de PCR de colônia. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 27).

Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de *P. pastoris* X-33 transformadas com o vetor recombinante *Afccl6A/pPICZαA*

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1-16: Colônias de *P. pastoris* X-33 transformadas com o vetor recombinante *Afccl6A/pPICZαA*. 17: Controle positivo. 18: Colônia de *P. pastoris* X-33 transformada com o vetor pPICZαA vazio. 19: Colônia de *P. pastoris* X-33. 20: Controle negativo.

As reações de PCR foram realizadas com os *primers* 5'-AOX1 e 3'-AOX1 (ambas as sequências já são especificadas no manual do vetor (em anexo)), adicionando 588 pb ao tamanho do inserto. Desse modo, eram esperadas bandas de aproximadamente 2000 pb, o que de fato foi observado para os clones nas colunas 3, 4, 5, 6, 10, 13, 14, 15 e 16 (bandas indicadas com uma seta vermelha), confirmando que os mesmos eram positivos.

Além disso, como a cepa selvagem *P. pastoris* X-33 possui fenótipo Mut⁺, sua transformação com um DNA plasmidial linearizado na região 5'-AOX1 gerou integrantes com o mesmo fenótipo e, por essa razão, uma segunda banda também pôde ser visualizada no gel (indicada com uma seta azul), correspondente à amplificação do gene da AOX1 (~2,2 kb). Observa-se essa mesma banda nas colunas 18 e 19, que correspondem, respectivamente, a uma colônia de *P. pastoris* transformada com o vetor pPICZαA vazio e a uma colônia de *P. pastoris* que não foi submetida à transformação. As 3 bandas que aparecem entre 250 e 750 pb indicaram contaminação, uma vez que esse mesmo padrão pode ser visualizado na coluna correspondente

ao controle negativo (coluna 20). Apesar disso, selecionou-se um dos clones integrantes para expressão heteróloga.

4.3.3 Expressão heteróloga em *P. pastoris* X-33, purificação da enzima recombinante e deglicosilação

A expressão da AfCel6A em *P. pastoris* foi realizada conforme descrito no item 3.4.5. Finalizados os 6 dias de indução com metanol 1,5% (v/v), a celobiohidrolase recombinante fusionada a uma cauda His₆ foi purificada a partir do sobrenadante da cultura por cromatografia de afinidade. Todas as frações coletadas durante a purificação foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 28a).

Figura 28 – Análises por SDS-PAGE da AfCel6A após a) purificação e b) deglicosilação

a

a) Purificação da AfCel6A recombinante. M: Marcador de peso molecular (Precision™ Plus Protein Standards Dual Color – BioRad). 1: *Flow-through*. 2-5: Lavagem com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo NaCl 500 mM (pH 7,4). 6-14: Eluição da AfCel6A com 5, 10, 20, 40 (1), 40 (2), 80 (1), 80 (2), 160 e 250 mM de imidazol, respectivamente. b) Deglicosilação da AfCel6A. M: Marcador de peso molecular. 1: AfCel6A não-tratada. 2: AfCel6A após tratamento com Endo-H sob condição não-desnaturante.

Conforme pode ser visualizado no gel, a AfCel6A começou a se desligar da resina de níquel com 10 mM de imidazol, mas foi a partir de 20 mM que essa enzima passou a ser eluída em maior quantidade, terminando em 250 mM, com uma banda bem fraca. Todas as frações contendo a AfCel6A pura e em quantidade relevante foram combinadas e submetidas à troca de tampão para remoção do imidazol, rendendo cerca de 200 μg de proteína mL^{-1} .

Constatou-se também que a AfCel6A migrou como uma banda com peso molecular aparente de 65 kDa, ainda que seu peso estimado fosse 47,8 kDa. Para verificar se a presença de N-glicanos poderia estar causando essa discrepância, realizou-se a deglicosilação da AfCel6A com a enzima Endo-H (Figura 28b). Após o tratamento, o peso molecular da celobiohidrolase recombinante permaneceu praticamente o mesmo, o que condiz com a predição de que há somente um resíduo de asparagina na estrutura dessa enzima com potencial para N-glicosilação (N413).

4.3.4 Caracterização bioquímica e cinética da AfCel6A

4.3.4.1 Determinação das condições reacionais ótimas e estabilidade a diferentes temperaturas e pH

Uma vez pura e quantificada, iniciou-se a caracterização da celobiohidrolase recombinante pela investigação de suas condições reacionais ótimas. A enzima recombinante exibiu atividade máxima nas temperaturas de 55 e 60 °C, mas reteve mais de 54% dessa atividade entre 40 e 65 °C; a 70, 75 e 80 °C, a AfCel6A exibiu atividades relativas de 43, 30 e 26%, respectivamente (Figura 29a). A maioria das celobiohidrolases GH6 fúngicas reportadas exibiram temperaturas ótimas similares (Tabela 12). Algumas das exceções foram as enzimas CgCel6A de *C. graminicola* (CHRISTENSEN *et al.*, 2019) e MoCel6A de *M. oryzae* (TAKAHASHI *et al.*, 2010), com uma temperatura ótima de 40 °C. Além dessas, as celobiohidrolases TrCel6A (CHRISTENSEN *et al.*, 2019), CBH II (TUOHY *et al.*, 2002) e CBHII (SONG *et al.*, 2010), dos respectivos fungos *T. reesei*, *T. emersonii* e *T. viride*, exibiram atividade máxima em uma temperatura mais elevada (68-70 °C). A AfCel6A de *A. fumigatus* expressa em *A. oryzae* também apresentou uma temperatura ótima superior, equivalente a 70 °C (CHRISTENSEN *et al.*, 2019).

Figura 29 – Atividade e estabilidade da A/Cel6A em diferentes condições reacionais

a) Curva de temperatura. b) Curva de pH. c) Estabilidade térmica. d) Estabilidade a 50 °C. e) Estabilidade ao pH. As barras de erros representam os desvios padrões (n = 3).

Tabela 12 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes celobiohidrolases GH6 fúngicas

(continua)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx}	K _M	k _{cat}	k _{cat} /K _M	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>A. fumigatus</i> Af293	AfCel6A	<i>P. pastoris</i> X-33	CMC-Na	195,2 ± 4,65 U/mg	7,44 ± 0,51 mg/mL	147,9 s ⁻¹	19,9 mL mg ⁻¹ s ⁻¹	55-60 °C	pH 5,5-6,5	>70% após 24 h a 50 °C; cerca de 40% após 90 min a 60-80 °C; >25% após 30 min a 90 °C	>70% após 72 h a pH 3,0-10,0	Bernardi <i>et al.</i> , 2021b
<i>A. fumigatus</i>	AfCel6A	<i>A. oryzae</i>	Avicel PH101	-	48,6 ± 14,8 g/L	0,9 ± 0,1 s ⁻¹	-	70 °C	-	Nenhuma perda após 1 h a 60 °C	-	CHRISTENS EN <i>et al.</i> , 2019
<i>A. terreus</i>	AtCel6A	<i>A. oryzae</i>	Avicel PH101	-	-	-	-	50 °C	-	>90% após 1 h a 50 °C	-	CHRISTENS EN <i>et al.</i> , 2019
<i>T. funiculosus</i>	TfCel6A	<i>A. oryzae</i>	Avicel PH101	-	21,6 ± 3,2 g/L	0,5±0,02 s ⁻¹	-	60 °C	-	Nenhuma perda após 1 h a 50 °C	-	CHRISTENS EN <i>et al.</i> , 2019
<i>C. graminicola</i>	CgCel6A	<i>A. oryzae</i>	Avicel PH101	-	-	-	-	40 °C	-	>90% após 1 h a 40 °C	-	CHRISTENS EN <i>et al.</i> , 2019
	CgCel6B				89,0 ± 13,2 g/L	1,8 ± 0,2 s ⁻¹		50 °C		>90% após 1 h a 50 °C		

Tabela 12 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes celobiohidrolases GH6 fúngicas

(continuação)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx}	K _M	k _{cat}	k _{cat} /K _M	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>T. reesei</i>	TrCel6A	<i>A. oryzae</i>	Avicel PH101	-	24,3 ± 4,0 g/L	0,6±0,04 s ⁻¹	-	70 °C	-	Nenhuma perda após 1 h a 50 °C	-	CHRISTENS EN <i>et al.</i> , 2019
	Cel6A ^a	<i>P. pastoris</i> GS115	CMC-Na	10,7 mmol/min/ mg	0,31 mg/mL	-	-	60 °C	pH 5,5	90% após 30 min a 60 °C	-	SUN <i>et al.</i> , 2016
	Cel6A ^b	<i>P. pastoris</i> X-33	PASC	-	-	-	-	55 °C	pH 5,5-6,0	100% e 50% após 30 min a a 40 °C e 60 °C, respectivamente	Nenhuma perda em pH 5,0-6,0; rápida inativação em pH mais alcalino; instabilidade em pH mais acídico, após 30 min	BOONVITTH YA <i>et al.</i> , 2013
	CBHII	-	PASC	10 U/mg	3,8 mg/mL	-	-	60 °C	pH 5,0	80% após 30 min a 60 °C	Estável após 30 min na faixa de pH 3,5-6,0	OKADA <i>et al.</i> , 1998
<i>S. commune</i> KMJ820	CBH 2	-	pNPC	20,8 U/mg	1,4 mM	-	-	50 °C	pH 5,0	-	-	KONDAVEE TI <i>et al.</i> , 2020

Tabela 12 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes celobiohidrolases GH6 fúngicas

(continuação)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx}	K _M	k _{cat}	k _{cat} /K _M	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>P. occitanis</i> Pol 6	CBH II	-	pNPC	-	5 mM	-	-	65 °C	pH 4,0-5,0	Quase 100% a 30-50 °C; 50% a 60 °C; e inativação completa a 70 °C, após 30 min	Estável após 24 h em pH 2,0-9,0	LIMAM <i>et al.</i> , 1995
<i>T. emersonii</i> CBS814.70	CBH II	-	CNPG ₃	9,1 U/mg	4,5 mM	8,9 s ⁻¹	1,9 mM ⁻¹ s ⁻¹	68 °C	pH 3,8	t _{1/2} = 38 min a 80 °C (pH 5,0)	t _{1/2} = 38 min a pH 5,0 (80 °C)	TUOHY <i>et al.</i> , 2002
<i>T. viride</i> CICC13038	CBHII	<i>S. cerevisiae</i> H158	CMC-Na	-	-	-	-	70 °C	pH 5,0	-	-	SONG <i>et al.</i> , 2010
<i>N. patriciarum</i> J11	J11 CelA	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	β-glucana	-	-	-	-	50 °C	pH 6,0	>70% até 50 °C e cerca de 50% a 70 °C, após 1 h	>80% em pH 5,2-11,3; e aprox. 70% em pH 3,0, 4,2 e 12,3, após 1 h	WANG <i>et al.</i> , 2013
<i>I. lacteus</i> MC-2	Ex-4	<i>P. pastoris</i> X-33	PASC	-	-	-	-	50 °C	pH 5,0	>80% após 1 h a 60 °C (pH 3,0-8,0)	>80% após 1 h em pH 3,0-8,0 (60 °C)	TODA <i>et al.</i> , 2008

Tabela 12 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes celobiohidrolases GH6 fúngicas

(conclusão)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx}	K _M	k _{cat}	k _{cat} /K _M	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>C. thermophilum</i> HSAUP ₀₇₂₆₅₁	CBHII	<i>P. pastoris</i> GS115	pNPC	-	-	-	-	50 °C	pH 4,0	Nenhuma perda a 50 °C; aprox. 20% a 60 °C; e completa inativação a 80 °C, após 1 h	-	WANG <i>et al.</i> , 2012
<i>M. oryzae</i> Ina72	MoCel6A	<i>M. oryzae</i> Ina72	Celotetraose	454,5 µg/min/mg	24,3 mM	-	-	40 °C	pH 9,0	-	-	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2010
			Celopentaose	63,3 µg/min/mg	3,3 mM							

^a Gene otimizado

^b Gene nativo

Para avaliar sua termoestabilidade, as atividades residuais (%) da AfCel6A foram medidas após pré-incubação a 50, 60, 70, 80, ou 90 °C por diferentes tempos, na ausência do substrato (Figura 29c). Após 30 minutos a 60, 70, 80, e 90 °C, a enzima reteve 57,5%, 42,0%, 40,4%, e 26,9% de sua atividade inicial, respectivamente. A AfCel6A manteve ainda cerca de 30% de atividade após 3 h a 60–80 °C, mas foi completamente inativada após 5 horas nessas temperaturas. Por fim, a AfCel6A foi estável a 50 °C, uma vez que perdeu somente 30% de sua atividade inicial após 24 horas e reteve 64,2% e 47,7% após 48 e 72 h, respectivamente (Figura 29d).

Quando expressa em *A. oryzae*, a AfCel6A (CHRISTENSEN *et al.*, 2019) exibiu uma temperatura ótima de 70 °C, no entanto, apresentou menor estabilidade (na ausência do substrato) nessa temperatura do que a enzima expressa em *P. pastoris*. Além disso, a AfCel6A expressa em *P. pastoris* suportou melhor temperaturas mais elevadas do que a CBHII da espécie termofílica *C. thermophilum* (WANG *et al.*, 2012), que foi completamente inativada após ser mantida por 1 hora a 80 °C. Esses resultados mostraram que a AfCel6A foi resistente a altas temperaturas, especialmente a 50 °C, destacando-a como um potencial biocatalisador para aplicação no processo de sacarificação enzimática.

Investigou-se também a influência de diferentes condições de pH sobre a atividade e a estabilidade da AfCel6A. Os pH ótimos foram 5,5-6,0, e a enzima exibiu mais de 80% de atividade relativa em pH 5 e 6,5 (Figura 29b). Nos pHs mais extremos avaliados (pH 3,0 e pH 8,0), a AfCel6A exibiu cerca de 30% de atividade. Esse resultado foi condizente com os reportados para a maioria das celobiohidrolases GH6 fúngicas: praticamente todas as enzimas apresentadas na Tabela 12 exibiram atividade máxima em valores moderados de pH (entre 5,0 e 6,0); a MoCel6A de *M. oryzae* (TAKAHASHI *et al.*, 2010) foi a única a desempenhar melhor sua atividade em pH alcalino (pH 9,0); por fim, as celobiohidrolases de *T. emersonii* (TUOHY *et al.*, 2002) e *C. thermophilum* (WANG *et al.*, 2012) foram mais ácidas, exibindo pH ótimo entre 3,8-4,0.

Ao avaliar a estabilidade ao pH da AfCel6A, constatou-se que a enzima foi altamente estável em todas as condições a que foi submetida (pH 3,0-10,0) durante 72 horas (Figura 29e). A condição mais ácida (pH 3,0) foi a que mais impactou em sua estabilidade: após 24 horas de pré-incubação em pH 3,0, a atividade residual foi de aproximadamente 75%, enquanto que, após ser mantida a pH 4,0-10,0 por esse mesmo período de tempo, a enzima exibiu mais de 90% de atividade.

Da mesma forma, a enzima Cel6A de *T. reesei* (BOONVITTHYA *et al.*, 2013) também apresentou instabilidade em pH mais ácido. Similarmente, a enzima J11 CelA de *N. patriciarum*

(WANG *et al.*, 2013) exibiu uma atividade menor (equivalente a 70%) após ser mantida por 1 h nos pHs 3,0 e 4,2, em comparação às atividades obtidas após incubação em pH 5,2-11,3 (80%). Dentre as enzimas apresentadas na Tabela 12, somente a CBH II de *P. occitanis* (LIMAM *et al.*, 1995) foi avaliada quanto à sua estabilidade ao pH por tempos maiores (24 horas) e, assim como a AfCel6A, permaneceu estável em todas as condições testadas (pH 2,0-9,0).

4.3.4.2 Efeito de diferentes aditivos e produtos reacionais sobre a atividade da AfCel6A

De acordo com o que foi descrito anteriormente, a presença de íons e reagentes no meio reacional é um dos fatores que pode afetar a atividade das enzimas (PEREIRA *et al.*, 2017). Aditivos como sais, agentes quelantes e surfactantes são comumente utilizados para melhorar o desempenho de celulasas durante a despolimerização da celulose (OBENG *et al.*, 2017). Além disso, alguns íons podem estar presentes em solução como resultado da corrosão de equipamentos (PEREIRA *et al.*, 2017). Considerando que as celobiohidrolases são importantes componentes dos complexos celulolíticos utilizados na hidrólise de celulose em processos industriais, identificar os ativadores e inibidores da AfCel6A seria de extrema relevância (DOTSENKO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2017).

A Tabela 13 representa as atividades relativas (%) da AfCel6A sobre CMC na presença de diferentes íons e reagentes químicos.

Tabela 13 – Efeito de íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade da AfCel6A			
Aditivo	Atividade relativa (%)	Aditivo	Atividade relativa (%)
Nenhum	100,0 ± 0,9	CaCl ₂	101,1 ± 2,4
SDS	53,7 ± 0,3	FeSO ₄	125,8 ± 3,6
Tween 20	93,2 ± 2,1	MgSO ₄	95,9 ± 2,1
EDTA	91,9 ± 1,6	CuSO ₄	85,1 ± 0,7
Ácido ascórbico	121,4 ± 2,6	AgNO ₃	179,3 ± 20,0
DMSO	101 ± 3,6	KCl	98,9 ± 2,4
β-mercaptoetanol	134,2 ± 1,0	(NH ₄) ₂ SO ₄	99,9 ± 2,1
ZnSO ₄	83,7 ± 0,7	DTT	150,7 ± 5,3
MnCl ₂	189,3 ± 2,3	Triton X-100	91,6 ± 1,2
CoCl ₂	116,8 ± 1,4	SLS	93,8 ± 1,6

A atividade da AfCel6A praticamente não foi influenciada pela presença do agente quelante EDTA (91,9%), sugerindo que essa enzima não é uma metaloproteína (MELEIRO *et al.*, 2018; BENHMAD *et al.*, 2016). Ambos os agentes redutores β -mercaptoetanol (134,2%) e DTT (150,7%) estimularam a atividade enzimática, indicando que grupos sulfidríla de resíduos de cisteína livres são benéficos para a catálise pela AfCel6A (KARNCHANATAT *et al.*, 2008).

Os surfactantes testados provocaram efeitos distintos sobre a atividade da AfCel6A. A maioria das proteínas (incluindo a Af-EGL7 descrita anteriormente) são completamente inibidas na presença de SDS, contudo, a AfCel6A exibiu 53,7% de atividade. A exposição aos surfactantes não aniônicos Triton X-100 (91,6%) e Tween 20 (93,2%) praticamente não afetou a atividade da AfCel6A, assim como a presença de SLS (93,8%).

Íons metálicos podem ativar ou inibir a atividade das enzimas ao interagir com grupos amino e carboxila presentes nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (PEREIRA *et al.*, 2017). Além disso, os tamanhos dos raios iônicos também podem influenciar a atividade e a estabilidade das enzimas (PEREIRA *et al.*, 2017). A AfCel6A se mostrou resistente a todos os íons testados. K^+ (98,9%), NH_4^+ (99,9%), Mg^{2+} (95,9%) e Ca^{2+} (101,1%) não exerceram efeitos significativos. Cu^{2+} (85,1%) e Zn^{2+} (83,7%) promoveram um sutil decréscimo na atividade da enzima. Mn^{2+} (189,3%), Fe^{2+} (125,8%) e Co^{2+} (116,8%) foram ativadores da AfCel6A. Uma vez que os íons cúpricos causaram baixa inibição na atividade da AfCel6A e ela ainda foi estimulada por ácido ascórbico (121,4%), pode-se inferir que a mesma pode ser associada a LPMOs em um coquetel enzimático.

Conforme descrito anteriormente, celobiohidrolases são enzimas processivas que catalisam a liberação de moléculas de celobiose a partir das extremidades das cadeias celulósicas; esses dissacarídeos, por sua vez, são os alvos da catálise pelas β -glicosidases, sendo convertidos a glicose (VERMAAS *et al.*, 2019; AKRAM *et al.*, 2018). À medida que a despolimerização da celulose prossegue, esses dois açúcares se acumulam no meio reacional, podendo prejudicar a atividade das enzimas e, consequentemente, os rendimentos finais (BARAMÉE *et al.*, 2017; ATREYA *et al.*, 2016). Desse modo, a inibição por produto representa uma barreira a ser superada para que o processo seja eficiente (BARAMÉE *et al.*, 2017; ATREYA *et al.*, 2016). Nesse sentido, a tolerância de celulasas à inibição por celobiose e glicose constitui uma importante característica a ser considerada durante a seleção de enzimas para aplicações industriais.

Ao investigar o efeito de diferentes concentrações de celobiose (10-100 mM) e glicose (10-250 mM) sobre a atividade da AfCel6A, verificou-se que essa celobiohidrolase foi resistente à inibição por esses açúcares (Figura 30). A adição de glicose nas concentrações finais de 100

e 250 mM provocou reduções de apenas 12 e 13%, respectivamente, na atividade enzimática. A presença de celobiose, um inibidor direto das celobiohidrolases (ANDRIĆ *et al.*, 2010), inibiu cerca de 50% da atividade da enzima recombinante na concentração de 100 mM.

O valor de IC_{50} (concentração de inibidor que divide pela metade a taxa da reação catalisada por enzima) pode ser utilizado para comparar a tolerância à presença de inibidores de diferentes enzimas. O IC_{50} obtido para a Cel6A de *T. reesei*, descrita como a celobiohidrolase mais eficiente, foi de 240 mM para glicose e 20 mM para celobiose (TEUGJAS & VÄLJAMÄE, 2013). A Cel6A de *C. thermophilum* exibiu um IC_{50} de 301 mM para glicose e 28 mM para celobiose (TEUGJAS & VÄLJAMÄE, 2013). A AfCel6A, por sua vez, foi mais tolerante à inibição por esses produtos do que ambas as enzimas citadas, com um $IC_{50} > 250$ mM para glicose e equivalente a 100 mM para celobiose. Esses resultados indicam que, também no quesito resistência à inibição por produtos reacionais, a AfCel6A possui potencial para aplicação biotecnológica.

Figura 30 – Efeito de glicose e celobiose sobre a atividade da AfCel6A

As barras de erros representam os desvios padrões (n = 3).

4.3.4.3 Avaliação da especificidade da AfCel6A por diferentes substratos e determinação dos seus parâmetros cinéticos

As celobiohidrolases são enzimas bem conhecidas por sua ação preferencial sobre as regiões cristalinas da celulose. Contudo, ao avaliar a especificidade da AfCel6A por diferentes substratos, constatou-se que a enzima exibiu maiores atividades sobre ambos CMC (100%) e Avicel (91,8%), o que sugere que ela exerce ambos os modos endo- e exo- de ação (Tabela 14).

Essa mesma propriedade já foi reportada para outras celobiohidrolases GH6 e pode ser decorrente da estrutura do sítio ativo dessas enzimas em formato de túnel com “paredes” e “tetos” flexíveis (BARAMEE *et al.*, 2017). Por fim, a AfCel6A também foi capaz de atuar com menor intensidade sobre os substratos xilana (54,1%) e xiloglucana (50,9%).

Tabela 14 – Atividades relativas (%) da AfCel6A sobre diferentes substratos

Substrato	Atividade Relativa (%)
CMC	100,0 ± 5,4
Avicel	91,8 ± 6,5
Xilana	54,1 ± 0,4
Xiloglucana	50,9 ± 0,8

Os parâmetros cinéticos da AfCel6A foram determinados sobre CMC, devido à maior facilidade de se trabalhar com esse substrato (em comparação ao Avicel), especialmente em termos de solubilidade em soluções aquosas. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15 – Parâmetros cinéticos obtidos para a AfCel6A sobre o substrato CMC

$V_{\text{máx}}$	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M
195,2 ± 4,65 U mg ⁻¹	7,44 ± 0,51 mg mL ⁻¹	147,9 s ⁻¹	19,9 mL mg ⁻¹ s ⁻¹

4.3.5 Ensaios de sinergismo

A desconstrução completa da celulose requer a ação coletiva de endoglucanases, celobiohidrolases e β-glicosidases. Enquanto as endoglucanases catalisam o ataque às regiões amorfas da cadeia celulósica, as processivas celobiohidrolases contribuem para a degradação das regiões cristalinas; desse modo, a associação entre ambas as enzimas é fundamental para a eficiência do processo (BARAMEE *et al.*, 2017; LE COSTAOUËC *et al.*, 2013). A fim de avaliar a capacidade da AfCel6A recombinante de atuar em sinergia com outras celulasas sobre diferentes substratos, foram realizados experimentos de hidrólise combinando a AfCel6A com a Af-EGL7 recombinante de *A. fumigatus* (expressa em *P. pastoris*) ou com o coquetel Celluclast®1.5L

4.3.5.1 Desempenho da *Af*Cel6A associada ao coquetel ou à *Af*-EGL7 durante a sacarificação de CMC

Inicialmente, as hidrólises foram realizadas sobre CMC utilizando-se diferentes proporções das enzimas (Figura 31). As proporções enzimáticas utilizadas em experimentos de sinergismo não seguem um padrão, variando muito entre diferentes estudos (VAN DYK & PLETSCHE *et al.*, 2012). Desse modo, para os experimentos envolvendo *Af*Cel6A/Celluclast®1.5L, as proporções de concentração utilizadas foram 10:1, 1:1 ou 1:10 (Figura 31a), enquanto para a associação *Af*Cel6A/*Af*-EGL7 foram testados os raios 50:1, 10:1, 1:1, e 1:10 (Figura 31b). As reações foram realizadas em pH 6, a 50 °C, sob agitação de 1000 rpm, na presença de CMC 1% (p/v). A liberação de açúcares redutores foi monitorada após 4, 8 e 24 horas de reação.

Figura 31 – Avaliação do sinergismo entre a) *Af*Cel6A e Celluclast®1.5L ou b) *Af*Cel6A e *Af*-EGL7 durante a hidrólise de CMC.

Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS e apresentados como percentuais do rendimento máximo teórico. Os dados representam as médias $\pm$ desvios padrões obtidas a partir de 4 réplicas

experimentais. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao controle (coquetel ou *Af*-EGL7 isolados).

Como pode ser observado na Figura 31a, todas as combinações entre o coquetel e a *Af*Cel6A resultaram na ação sinérgica entre essas celulasas, promovendo melhores rendimentos de açúcares em comparação ao controle (coquetel isolado). Contudo, os maiores aumentos observados foram obtidos com as proporções *Af*Cel6A/Celluclast®1.5L 10:1 e 1:1, equivalentes a 326% e 291%, respectivamente, após 24 horas de reação. Constatou-se um perfil similar para as reações envolvendo a associação entre *Af*Cel6A e *Af*EGL7.

As celulasas recombinantes de *A. fumigatus* exibiram sinergismo durante a degradação de CMC em todas as proporções avaliadas, com exceção da proporção 1:10. De fato, já foi reportado que a utilização de endoglucanases em uma menor proporção resulta em maiores efeitos sinérgicos (JUNG *et al.*, 2008). Os maiores aumentos observados na liberação de açúcares foram de 1100% e 1050% após 24 horas de reação, promovidos pela utilização de *Af*Cel6A/*Af*-EGL7 50:1 e 10:1, respectivamente. Considerando as combinações que promoveram ótimos rendimentos envolvendo o uso de menores quantidades de enzimas, as proporções *Af*Cel6A + Celluclast®1.5L 1:1 e *Af*Cel6A + *Af*-EGL7 10:1 foram selecionadas para os ensaios subsequentes de sacarificação de biomassas lignocelulósicas.

4.3.5.2 Desempenho da *Af*Cel6A associada ao coquetel ou à *Af*-EGL7 durante a sacarificação de diferentes biomassas lignocelulósicas

Além das proporções e características enzimáticas, o efeito sinérgico das enzimas também depende das particularidades de cada substrato (MALGAS *et al.*, 2017; VAN DYK & PLETSCHE *et al.*, 2012). Desse modo, realizou-se a degradação de diferentes resíduos agrícolas utilizando-se as melhores proporções definidas anteriormente nos experimentos com CMC (Figura 32). As reações foram conduzidas sob as mesmas condições anteriores, na presença de uma das biomassas (SEB, palha de arroz ou sabugo de milho) em concentração final de 1% (p/v). Os açúcares redutores foram monitorados após 24 e 48 horas de reação.

Figura 32 – Avaliação do sinergismo entre a) *Af*Cel6A e Celluclast®1.5L na proporção 1:1 e b) *Af*Cel6A e *Af*-EGL7 na proporção 10:1 sobre diferentes resíduos agrícolas

a

b

Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS e apresentados como percentuais do rendimento máximo teórico. Os dados representam as médias $\pm$ desvios padrões obtidas a partir de 4 réplicas experimentais. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao controle. As barras brancas representam os controles (coquetel ou *Af*-EGL7 adicionados isoladamente), as barras pretas representam a associação *Af*Cel6A + Celluclast® 1.5L 1:1 e as barras cinzas representam a associação *Af*Cel6A + *Af*-EGL7 10:1.

Conforme apresentado na Figura 32a, a *Af*Cel6A atuou sinergicamente com as celulases comerciais sobre SEB e sabugo de milho, mas nenhum efeito sinérgico foi detectado sobre palha de arroz. A adição da *Af*Cel6A intensificou a desconstrução de SEB pelo coquetel em cerca de 71% e 97% após 24 e 48 horas, respectivamente. Para o sabugo de milho, os aumentos na liberação de açúcares foram de 90% e 60% após os respectivos tempos de 24 e 48 horas.

A combinação entre as enzimas recombinantes *Af*Cel6A e *Af*-EGL7 de *A. fumigatus* intensificou a degradação das três biomassas lignocelulósicas (Figura 32b). Contrastando os resultados obtidos ao associar a *Af*Cel6A com o coquetel, a associação entre *Af*Cel6A e *Af*-EGL7 resultou em um maior efeito sinérgico sobre palha de arroz, uma vez que a endoglucanase sozinha sequer foi capaz de atuar sobre essa biomassa. Para as outras duas biomassas, os

seguintes aumentos foram constatados após 24 e 48 horas, respectivamente: 120% e 168% para SEB, e 113% e 117% para sabugo de milho.

Esses resultados mostram que a AfCel6A é capaz de atuar em sinergia com outras celulasas, promovendo aumentos substanciais nos rendimentos de açúcares tanto a partir de um substrato celulósico simples quanto a partir de biomassas mais complexas. Com isso, fica ainda mais evidente que essa enzima recombinante constitui um importante alvo para aplicação na otimização de coquetéis enzimáticos utilizados em biorrefinarias.

4.4 UMA XILANASE GH10 TERMOFÍLICA, TOLERANTE AO pH E ALTAMENTE ATIVA DE *Aspergillus fumigatus* INTENSIFICOU A SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO PELAS CELULASES

Resultados publicados: Bernardi, A.V.; Gerolamo, L. E.; Uyemura, S. A.; Dinamarco, T. M. A thermophilic, pH-tolerant, and highly active GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* boosted pre-treated sugarcane bagasse saccharification by cellulases. *Industrial Crops and Products*, 160, 113697, 2021.

4.4.1 Análises de sequência e estrutura da Af-XYLA

O gene Afu6g13610 de *A. fumigatus* (nomeado Af-*xylA*) possui uma ORF de 1194 pb que codifica uma endo-1,4- β -xilanase (Af-XYLA) com 397 resíduos de aminoácidos e um peso molecular teórico de 42,14 kDa (<http://www.aspergillusgenome.org/>; <https://www.uniprot.org/uniprot/Q4WLG5>). Com base na similaridade da sequência e de acordo com o banco de dados CAZy, a Af-XYLA pertence à família 10 das glicosil hidrolases. Xilanases GH10 caracterizam-se por serem menos seletivas, podendo hidrolisar desde cadeias de xilana com diferentes graus de substituição até pequenos xilooligossacarídeos (MHIRI *et al.*, 2020; MONCLARO *et al.*, 2019; van den BRINK & de VRIES, 2011).

O genoma de *A. fumigatus* Af293 contém 3 genes codificantes de endoxilanases GH10 (Afu6g13610, Afu4g09480 e Afu3g15210). Dentre esses, somente o Af-*xylA* codifica uma enzima contendo um CBM1 associado ao seu domínio catalítico, localizado nos resíduos 361-397 do C-terminal (SEGATO *et al.*, 2014). Nas xilanases GH10, essas estruturas modulares encontram-se tipicamente conectadas ao domínio catalítico por meio de uma pequena e flexível estrutura (MIAO *et al.*, 2018). Diferentes famílias de CBM podem ser encontradas associadas

a xilanases (por exemplo: CBM1, CBM2, CBM6 e CBM22), as quais podem desempenhar diferentes funções de ligação. No caso específico do CBM1, o alvo de ligação são as superfícies cristalinas da celulose (MIAO *et al.*, 2018). Mesmo que o substrato-alvo da catálise pelas xilanases não seja a celulose, a presença do CBM1 pode impactar positivamente na adsorção e na ação dessas enzimas sobre a xilana, em decorrência da elevada proximidade entre as porções celulósica e hemicelulósica na matriz da parede celular vegetal (MIAO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2013).

Análises da sequência da Af-XYLA realizadas nos *softwares* SignalP e NetNGlyc 1.0 revelaram, respectivamente, um peptídeo sinal nos resíduos 1-19 do N-terminal e um potencial sítio de N-glicosilação no resíduo de asparagina N120. Esse peptídeo sinal foi removido antes da clonagem do gene *Af-xylA* no vetor pPICZαA. A sequência do gene foi clonada “in frame” com a sequência do peptídeo sinal fator α (da levedura *S. cerevisiae*) presente no vetor – um passo essencial para a obtenção de uma enzima recombinante extracelular.

O alinhamento múltiplo entre a Af-XYLA e as sequências de aminoácidos de outras xilanases GH10 fúngicas (Figura 33a) revelaram 62,28%, 60,3%, 48,43%, 46,67%, 45,48% e 43,49% de identidade com as enzimas de *T. cellulolyticus* (INOUE *et al.*, 2015), *G. trabeum* (KIM *et al.*, 2014b), *T. aurantiacus* (NATESH *et al.*, 1999), *A. terreus* (CHANTASINGH *et al.*, 2006), *T. leycettanus* (WANG *et al.*, 2016) e *A. fumigatus* (CHANG *et al.*, 2017), respectivamente. A partir dele, foi possível identificar algumas importantes regiões conservadas e prever os dois possíveis resíduos catalíticos da Af-XYLA – E150 e E257. Xilanases pertencentes às famílias GH10 e GH11 catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas através de um mecanismo de retenção envolvendo dois resíduos de glutamato: um deles que atua como nucleófilo e o outro que age ora como ácido, ora como base (HOFFMAM *et al.*, 2016; SEGATO *et al.*, 2014).

A estrutura tridimensional da Af-XYLA foi predita por modelagem por homologia através do *software* Phyre2, e foi manipulada utilizando-se as ferramentas de edição do Swiss-PDB viewer (Figura 33b). Como pode ser observado, e conforme era esperado para uma xilanase GH10, a Af-XYLA exibe uma estrutura de barril TIM clássico $[(\beta/\alpha)_8]$, que consiste em 8 α-hélices (destacadas em rosa) e 8 folhas β (destacadas em lilás) ao redor de um sítio ativo de sulco profundo. Tal estrutura é condizente com a atividade endo-hidrolítica desta enzima (LIEW *et al.*, 2019; ULLAH *et al.*, 2019; SEGATO *et al.*, 2014). Foram identificados 6 resíduos de cisteína (em verde) aptos a formarem pontes dissulfeto (destacadas em amarelo). Os dois possíveis resíduos catalíticos e o resíduo de asparagina com potencial para ser glicosilado estão destacados em vermelho e laranja, respectivamente.

Figura 33 – Análises de a) sequência e b) estrutura da *Af*-XYLA

Af-XYLA	M-----	1
Aspergillus fumigatus	M-----	1
Talaromyces leycettanus	M-----	1
Aspergillus terreus	M-----	1
Thermoascus aurantiacus	M-----	1
Gloeophyllum trabeum	MSFKTLVAVLCLVPVALAQQPAWAQCGGQGTGGTTCVAGYSCVAQNSYYSQCLPTGSGS	60
Talaromyces cellulolyticus	M-----	1
Af-XYLA	VHLSLA-----AALAALPLVYGAGLNTAAKAKGLKYFGSATDNPE---LTD SAY	48
Aspergillus fumigatus	-RFLSATALLAGLATAAPS--SSKNDVNLDKLARRNGMLWFGTAADI PGTSETT DKSY	57
Talaromyces leycettanus	-RFLATAALLAGPALAAPAPRHHDDKDVGLNALAQRAKGLWFGTAADI PGTDETTDAAY	60
Aspergillus terreus	VRLTV--LAGFLLTSAACSACVIGERQAASSINNAFAKAGKKYFGTCGDQGT---LSDSTN	57
Thermoascus aurantiacus	VRPTILLTSLLLAPFAAASPILERQAQSV DQLIKARQKVFYGVATDQNR---LTTGKN	58
Gloeophyllum trabeum	GTVTST-----SVGSSPSATSTTPLNTAAKAAGKKYFGSATDNPE---LSDPAY	106
Talaromyces cellulolyticus	TLVKAI-----LLALAMGHVAQAQLNTAAKAAGLLYFGTAVDNPD---LSDSKY	47
.	:: : * : ** . *	:
Af-XYLA	VAQLSNTDDFGQITPGNSMKWDATPEPSQNSFSFANGDAVVNLANKNGQLMRCHTLVWHSQ	108
Aspergillus fumigatus	LSILR--KKFGEMTPANALKFMYTEPEQNVFNFTQGDYFMDLADHYGHAVRCHNLVWASQ	115
Talaromyces leycettanus	LKILENPANFGEITPANAMKFMYTEPEQNVFNFTQGDYFVLNLAERHGQRVRCCHNLVWASQ	120
Aspergillus terreus	SAIV--KADFGQLTPENSMKWDATEPNRGQFSFGADYLVNVAASNGKMIRGHTLVWHSQ	115
Thermoascus aurantiacus	AAII--QADFGQVTPEPSQNGFNFGADYLVNVAASNGKMIRGHTLVWHSQ	116
Gloeophyllum trabeum	VKILSDSTMEFGQITPGNSMKWDATPEPSRGFTTFTQGDQYLANLAKANGQLIRGHNCVWHNQ	166
Talaromyces cellulolyticus	IANLE-TADFGQITPANAMKWQPTPEPSQGSYFTFTQGDQIASLAKSNNDYLRCCHNLVWYNQ	106
:	***: ** : ** : . : . : . * . . : . : * . * . *	
Af-XYLA	LPNWVSSGSWTNATLLAAMKNHITNVVTHYKGCYAWDVVNEALNEDGTFRNSVFYQIIG	168
Aspergillus fumigatus	VSDVVTSRNWTATELKEVMKNHIFKTVQHFGKRCYAWDVVNEAVNGDGTFSSSVWYDTTG	175
Talaromyces leycettanus	LSDFVNNGNWTKESLTAVMRNHIFHVQHFGRRCYSWDVVNEALNGDGTFSSSIWYDTTG	180
Aspergillus terreus	LPGWVQGI-TDKNTLTSVLKNHITVMQVRKGYAWDVVNEIFNEDGSLRKSVFVNVLG	174
Thermoascus aurantiacus	LPSWVSSI-TDKNTLTVNMKNHITLMTTRYKKIRAWDVVNEAFNEDGSLRQTVFLNVIG	175
Gloeophyllum trabeum	LPSWVTSNGFNATLSSIITTHCGTGVGHYKGYISWDVNEPNDGTFRQDVVFYNTLIG	226
Talaromyces cellulolyticus	LPSYITSGSWTNATLIAALKEHINGVVTHYKGCYAWDVVNEALNEDGTFRQNVFYQYIG	166
:	: . : . * : * : : : : ***** . * ** : . : : : *	
Af-XYLA	PAYIPIAFATAAAA-----DPDVKLYNDYNIIEYSG-AKATAAQNIQVKMIKAYGAKIDGV	222
Aspergillus fumigatus	EEYFYLAFOYQAQEAQAQIHANQVKLYNDYGIENPG-PKADAVLKLVAELRKRGIRIDGV	234
Talaromyces leycettanus	EDYFYLAFOYQAQEAQAEIHANDVVKLYNDYGIENPG-PKADAVHNLVKELRKRIDIGI	239
Aspergillus terreus	EDFVRIAFETARSV-----DPQAKLYINDYNLDNANYAKTKGMADHVRKWI SQGIPIDGI	229
Thermoascus aurantiacus	EDYIPIAFQATARAA-----DPNAKLYINDYNLDASYPKTQAI VNRVKQWRAAGVPIDGI	230
Gloeophyllum trabeum	QDYISIALTAARAA-----DPDAKLYINDYIEGTG-AKSTAMVNLVKSLSKAANVPIDGI	280
Talaromyces cellulolyticus	EAYIPIAFAAAAA-----DPNAKLYNDYNIIEYAG-SKATGAQRIVKLIQAAGGRIDGV	220
:	: . : * . : . : *** ** : : . * : . * . : ***:	
Af-XYLA	GLQAHFIVGSTPSQSDLTITVLKGYTALGVEVAYTELDIRMQLPS--TAAKLAQQSTDFQG	280
Aspergillus fumigatus	GLESHFIVGETPSLADQLATKKAYIEAGLEVAITELDVRFSQAPFYTAEAQKQQAADYYA	294
Talaromyces leycettanus	GLESHFEVGFTPSLQDQLSTKQGYIALGLDVAITELDVRFTQAPYYDAAGEKQQAQDYIT	275
Aspergillus terreus	GSQTHLGSAGSVTVKDALNTL--ASSGVSEVAITELDIAG-----ASSTDYVN	299
Thermoascus aurantiacus	GSQTHLSAQGGAGVLQALPLL--ASAGTPEVAITELDVAG-----ASPTDYVN	276
Gloeophyllum trabeum	GVQAHLLVQGVQVPT--LEANLRQFTALGVEVAITELDIRMTLPA--TDALLAQKKQDYQT	336
Talaromyces cellulolyticus	GLQSHFIVGQTPSLATQKANMAAFTALGVDVAITELDIRMTLPD--TSALQTOQSTDYQT	278
*	: : * : ** ** : : . * : . *	:
Af-XYLA	VAAACVS-TTGCVGVTIWDWTDKYSWVPVSFQGYGAPLPWDENYVKKPAYDGLMAGLGAS	339
Aspergillus fumigatus	SVASCKHAGPRCVGVVWDFDDAYSWIPGTFEGQGGACLYNETLEVKKAFYAAAAEALENK	354
Talaromyces leycettanus	SVSSCIEAGPKCIGITVWDFDDKYSWVPYTFAGQGGADIYNATLQAKPAYATADALQKG	359
Aspergillus terreus	VVNACLS-VSKCVGITVWGVSDKYSWRSN-----DKPLLFDSNFQPKAAYNAI ISAL---	326
Thermoascus aurantiacus	VVNAACL-VQSCVGITVWGVADPPDSWRAS-----TTPLLFDFGNFPKPAYNAIVQDLQO-	329
Gloeophyllum trabeum	VIACKA-VSGCIGVTIWDYTDKYSWVPSTFSGQGAALPWDANLNKKPAYDGIAGFAS-	394
Talaromyces cellulolyticus	TTTACVQ-TKGCVGITLWDYTDKYSWVPSTFSGQGDACPDWSNKNKPAYIGILAGLQSG	337
:	* : * : . : * * : : . : * * : . :	
Af-XYLA	SGSTTTTTT-----TTSTTTGGTDPTGVAQKWGQCGGIGWTGPTTCVSGTTCQ	387
Aspergillus fumigatus	PCTVC-----	359
Talaromyces leycettanus	ACSV-----	364
Aspergillus terreus	-----	326
Thermoascus aurantiacus	-----	329
Gloeophyllum trabeum	-----	394
Talaromyces cellulolyticus	TGSSSSSTSTTTT-----TTTPTTASSTTSTTSTSATSGAAHWGQCGGIGWSGPTICVSPYTCQ	397
Af-XYLA	KLNDWYSQCL 397	
Aspergillus fumigatus	----- 359	
Talaromyces leycettanus	----- 364	
Aspergillus terreus	----- 326	
Thermoascus aurantiacus	----- 329	
Gloeophyllum trabeum	----- 394	
Talaromyces cellulolyticus	VLNPPYSQCL 407	

b

a) Alinhamento múltiplo da sequência da *Af*-XYLA com uma outra xilanase GH10 de *A. fumigatus* (XM_749010.1) e com as enzimas de *T. leycettanus* (KX228205), *A. terreus* (AB040414), *T. aurantiacus* (PMID: 10329194), *G. trabeum* (HQ730916) e *T. cellulolyticus* (AB796434), realizado com a ferramenta Clustal Omega. As posições com resíduos únicos e totalmente conservados estão indicadas por asteriscos (*). As posições com resíduos altamente similares estão indicadas por dois pontos (:). As posições de resíduos com baixa similaridade estão indicadas por um ponto (.). Os dois possíveis resíduos catalíticos estão destacados em cinza. O potencial sítio de N-glicosilação está indicado por (#). Os resíduos de cisteína aptos a formarem pontes dissulfeto estão indicados por (&). b) Estrutura tridimensional da *Af*-XYLA (97% dos resíduos modelados com mais de 90% de confiança a partir de estruturas cristalográficas publicadas no banco de dados PDB). As estruturas secundárias α -hélices, folhas β e voltas estão destacadas em rosa, lilás e cinza, respectivamente. Possíveis resíduos catalíticos e potencial sítio de N-glicosilação estão destacados em vermelho e laranja, respectivamente. Resíduos de cisteína aptos a formarem pontes dissulfeto (C100, C142, C285, C291, C380, and C396) estão destacados em verde, e as ligações S-S estão destacadas em amarelo.

4.4.2 Amplificação e clonagem do gene *Af*-xylA

O gene *Af*-xylA foi amplificado por PCR a partir do cDNA de *A. fumigatus* e, após a reação, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (Figura 34).

Figura 34 – Eletroforese em gel de agarose 1% após amplificação do gene *Af-xylA* com os *primers* para clonagem em pPICZ α A

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1: Controle negativo. 2-6: Gene *Af-xylA* amplificado.

Foram observadas bandas correspondentes ao gene da xilanase (1194 pb) entre 1000 e 1500 pb, nas colunas 2, 3, 4, 5 e 6. As 5 bandas foram recortadas para posterior extração dos fragmentos amplificados. A etapa seguinte consistiu na clonagem do inserto *Af-xylA* no vetor pPICZ α A, previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*, através do método CPEC (item 3.4.3), e o produto reacional foi diretamente transformado em *E. coli* DH10 β quimiocompetente. Após 16 horas de crescimento a 37 °C, procedeu-se com a PCR das colônias crescidas na placa para averiguar quais eram efetivamente positivas (Figura 35).

Figura 35 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de *E. coli* DH10 β transformadas com o produto da clonagem do inserto *Af-xyIA* no vetor pPICZ α A por CPEC

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1: Controle positivo. 2: Controle negativo. 3-32: Colônias de *E. coli* DH10 β submetidas a PCR.

Dos 30 clones testados (colunas 3-32), somente um era falso positivo (clone 2, na coluna 4), conforme evidenciado pelas bandas em aproximadamente 1000 pb. Um deles foi enviado para sequenciamento, a fim de identificar possíveis mutações e se o gene foi clonado no vetor “in frame” com o peptídeo sinal fator α .

Uma vez confirmado o sucesso da clonagem, o vetor *Af-xyIA*/pPICZ α A foi linearizado com a enzima de restrição *PmeI* e transformado em células eletrocompetentes de *P. pastoris* X-33. Após 3 dias de crescimento a 30 °C, realizou-se um *screening* dos clones recombinantes de *P. pastoris* através de PCR de colônia. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 36).

Figura 36 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônias de *P. pastoris* X-33 transformadas com o vetor recombinante *Af-xyIA/pPICZαA*

M: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder - Thermo Scientific). 1-4: Colônias de *P. pastoris* X-33 transformadas com o vetor recombinante *Af-xyIA/pPICZαA*. 5: Controle positivo. 6: Controle negativo.

As reações de PCR foram realizadas com os *primers* 5'-fator α (que se anela ao início da sequência do peptídeo sinal fator α presente no vetor) e 3'-AOX1, adicionando 299 pb ao tamanho do inserto. Desse modo, eram esperadas bandas de aproximadamente 1500 pb. Contudo, constatou-se que as bandas dos clones positivos (1, 3 e 4) estavam em uma posição acima da estimada (entre 2000 e 2500 pb), o que novamente pode ser justificado pela utilização do corante GelRed. Um padrão de 3 bandas (em aproximadamente 1000, 750 e 500 pb) foi observado em todas as colunas do gel, inclusive no controle negativo (coluna 6), o que é indicativo de contaminação de algum reagente utilizado nas reações de PCR. Apesar disso, selecionou-se um dos clones positivos para expressão heteróloga.

4.4.3 Expressão heteróloga em *P. pastoris* X-33, purificação da enzima recombinante e deglicosilação

Após 6 dias de indução da expressão gênica com metanol 1% (v/v), o sobrenadante da cultura contendo a *Af*-XYLA recombinante fusionada a uma cauda His₆ foi separado por centrifugação, concentrado e, por fim, submetido à cromatografia de afinidade, conforme a descrição no item 3.4.6. Todas as frações coletadas durante a purificação da *Af*-XYLA foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 37a).

Figura 37 – Análises por SDS-PAGE da Af-XYLA após a) purificação e b) deglicosilação

a) Purificação da Af-XYLA recombinante. M: Marcador de peso molecular (Precision™ Plus Protein Standards Dual Color – BioRad). 1: *Flow-through*. 2-4: Lavagem com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo NaCl 500 mM (pH 7,4). 5-14: Eluição da Af-XYLA com 5, 10, 20, 40 (1), 40 (2), 80 (1), 80 (2), 160, 250 e 500 mM de imidazol, respectivamente. b) Deglicosilação da Af-XYLA. M: Marcador de peso molecular (LMW SDS Marker – GE Healthcare). 1: Af-XYLA não-tratada. 2: Af-XYLA após tratamento com Endo-H sob condição não-desnaturante.

Como pode ser observado na imagem do gel, a *Af*-XYLA começou a ser eluída em quantidade relevante a partir de 10 mM, terminando em 250 mM de imidazol. As frações contendo a xilanase recombinante pura foram combinadas e submetidas à troca de tampão para remoção do imidazol. Ao final, a enzima foi obtida com um rendimento de cerca de 1,0 mg mL⁻¹.

Também foi possível observar que a banda eletroforética correspondente à *Af*-XYLA estava em uma posição levemente mais alta do que a esperada para o seu peso molecular estimado (42 kDa), o que possivelmente ocorreu devido à presença de N-glicanos em sua estrutura. Assim, para esclarecer essa diferença, procedeu-se com a deglicosilação com a enzima Endo-H. De fato, após o tratamento, verificou-se uma sutil diferença na migração da banda (Figura 37b), o que corrobora a predição anterior de que há apenas um sítio na estrutura da *Af*-XYLA com potencial para sofrer N-glicosilação.

4.4.4 Análise de Zimograma: visualização da atividade enzimática da *Af*-XYLA em gel de poliacrilamida contendo xilana

Uma vez pura e quantificada, iniciou-se a caracterização da *Af*-XYLA recombinante com um zimograma, de modo a investigar a habilidade da enzima de hidrolisar a Xilana incorporada em um gel de poliacrilamida. De fato, após corar o gel com Vermelho Congo e, em seguida, descorar com NaCl, foi possível observar o aparecimento de uma banda de coloração vermelho pálido, correspondente ao halo de degradação do substrato (Figura 38).

Figura 38 – Análise de zimograma da *Af*-XYLA

a) Gel SDS-PAGE espelho, corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 e b) Gel SDS-PAGE contendo 0,5% (p/v) xilana, corado com Vermelho Congo 0,1% (p/v). M: Marcador de peso molecular (Precision™ Plus Protein Standards Dual Color – BioRad). 1: *Af*-XYLA recombinante pura.

4.4.5 Caracterização bioquímica e cinética da *Af*-XYLA

4.4.5.1 Determinação das condições reacionais ótimas e estabilidade a diferentes temperaturas e pH

A xilanase recombinante exibiu atividade máxima sobre xilana na faixa de pH 5,0-7,0 (Figura 39a), mas a enzima reteve ainda aproximadamente 80% dessa atividade em pH 4,0 e 8,0; em uma condição mais ácida (pH 3,0), somente cerca de 20% da atividade foi mantida.

Conforme apresentado na Tabela 16, esses resultados condizem com os que foram reportados para a maioria das xilanases GH10 de fungos, as quais exibiram atividades ótimas em uma faixa de pH ácida-neutra (4,0-7,0). Uma exceção foi a enzima de *A. nidulans* KK-99, que apresentou um desempenho superior em condição alcalina (pH 8,0) (INOUE *et al.*, 2015). Um perfil similar pôde ser observado nos ensaios de estabilidade. Quando a *Af*-XYLA foi pré-incubada por 72 horas na faixa de pH 4,0-8,0, na ausência de seu substrato, as atividades residuais obtidas foram de aproximadamente 80%. Em contrapartida, quando essa pré-incubação foi realizada a pH 3,0, a atividade residual foi inferior (53%) (Figura 39c). Similarmente, a xilanase GH10 de *T. aurantiacus* mostrou-se muito mais estável em pH acima de 4,0 (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Mais especificamente, a enzima exibiu 90% de atividade

residual após ser mantida durante 24 horas na faixa de pH 4,0-10,0; esse percentual caiu para 62% quando a incubação foi realizada em pH 3,5.

A Af-XYLA apresentou temperatura ótima de 80 °C e reteve 73% de sua atividade máxima em uma condição ainda mais extrema (90 °C) (Figura 39b). Um número limitado de xilanases GH10 exibiu atividade ótima em uma temperatura tão alta quanto 80 °C, sendo elas a XynA de *H. insolens* (DU *et al.*, 2013), a XynD de *P. funiculosum* (LAFOND *et al.*, 2011), a MpXyn10A de *M. pulchella* (RIBEIRO *et al.*, 2014), a TlXyn10A de *T. leycettanus* (WANG *et al.*, 2016) e a Xyl10A de *T. cellulolyticus* (INOUE *et al.*, 2015). Além dessas, destaca-se ainda as enzimas Xyn10B de *M. thermophila* (USTINOV *et al.*, 2008) e XYL10C de *Bispora* sp. (LUO *et al.*, 2009), que exibiram uma temperatura ótima de 85 °C, conforme demonstrado na Tabela 15.

A Af-XYLA também apresentou boa termoestabilidade quando pré-incubada em diferentes temperaturas na ausência de seu substrato. A 40 e 50 °C (Figura 39d), reteve cerca de 80% de sua atividade inicial após 16 horas de pré-incubação nessas temperaturas. Ainda a 50 °C, quando o período de pré-incubação foi estendido até 24 horas, houve uma perda de 40% da atividade inicial; contudo, a Af-EGL7 permaneceu estável durante as 48 horas seguintes (Figura 39e). Por outro lado, quando submetida a temperaturas mais extremas (80 e 90 °C) durante 30 minutos, a enzima recombinante tornou-se completamente inativa. É importante destacar novamente o efeito estabilizador provocado pelo substrato, uma vez que, na presença do mesmo, a enzima apresentou atividade ótima a 80 °C. Anbarasan *et al.* (2010) e Xiong *et al.* (2004) reportaram efeitos similares para a XYN10A de *T. flexuosa* e para uma xilanase GH11 de *T. lanuginosus*, respectivamente: ambas exibiram maiores termoestabilidades na presença do substrato, especialmente em condições mais acídicas. O mecanismo molecular envolvido nesse efeito ainda não foi esclarecido, mas uma possível explicação são as mudanças conformacionais causadas pela ligação do substrato ao sítio ativo da enzima (ANBARASAN *et al.*, 2010; XIONG *et al.*, 2004; LEJEUNE *et al.*, 2001).

A termoestabilidade da Af-XYLA foi superior à de muitas xilanases GH10 fúngicas descritas, incluindo a Xyl10g de *G. trabeum* (KIM *et al.*, 2014b), a xilanase BCC129 de *A. terreus* (CHANTASINGH *et al.*, 2006) e as enzimas XynA e XynC de *P. chrysosporium* (DECELLE *et al.*, 2004). Sua estabilidade térmica foi similar à da Af-XYNA (codificada pelo gene Afu3g15210) (CHANG *et al.*, 2017), também de *A. fumigatus* Af293: ambas foram altamente estáveis até 1 hora de pré-incubação a 60 °C, mas apresentaram uma perda mais brusca de atividade a 70 °C (cerca de 30% de atividade residual após 1 hora nessa temperatura). Por outro lado, a xilanase de *T. aurantiacus* (OLIVEIRA *et al.*, 2010) e as enzimas Xyl10A

(INOUE *et al.*, 2015), *TXyn10A* (WANG *et al.*, 2016), *MpXyn10A* (RIBEIRO *et al.*, 2014), *XynD* (LAFOND *et al.*, 2011) e *XYL10C* (LUO *et al.*, 2009), das respectivas espécies fúngicas *T. cellulolyticus*, *T. leycettanus*, *M. pulchella*, *P. funiculosum*, e *Bispora* sp. MEY-1, suportaram melhor temperaturas superiores a 70 °C.

Figura 39 – Atividade e estabilidade da Af-XYLA em diferentes condições reacionais

a) Curva de pH. b) Curva de temperatura. c) Estabilidade ao pH. d) Estabilidade térmica. e) Estabilidade a 50 °C. As barras de erros representam os desvios padrões (n = 3).

Tabela 16 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes xilanases GH10 fúngicas

(continua)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx} (U mg ⁻¹)	K _M (mg mL ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>A. fumigatus</i> Af293	<i>Af</i> -XYLA	<i>P. pastoris</i> X-33	Xilana ^a (<i>Beechwood</i>)	35756 ± 1279	1,62 ± 0,19	25039	15456	80 °C	pH 5,0- 7,0	Cerca de 80% de atividade residual após 16 h a 40 °C e 50 °C; 50% após 5 h a 60 °C e 30 min a 70 °C	80% de atividade residual após 72 h em pH 4,0-8,0 (a 4 °C)	Bernardi <i>et al.</i> , 2021a
			Xilana ^b (<i>Beechwood</i>)	88082 ± 2639	4,09 ± 0,39	61682	15081					
<i>A. fumigatus</i> Af293	<i>Af</i> -XYNA	<i>P. pastoris</i> GS115	Xilana (<i>Birchwood</i>)	268 ± 7	1,3 ± 0,1	-	-	75 °C	pH 5,0	>80% de atividade relativa após 1 h a 60 °C; perda rápida de atividade a 70 °C	>69% de atividade relativa em pH 3,0-8,0 e >46% em pH 9,0-11,0	CHANG <i>et al.</i> , 2017
<i>T. cellulolyticus</i> CF-2612	Xyl10A	<i>T. cellulolyticus</i> YP-4	Xilana (<i>Birchwood</i>)	-	2,51 ± 0,42	232 ± 12,4	92,2 ± 16,2	80 °C	pH 5,0	T _m = 81 °C	33% de atividade relativa em pH 3,4	INOUE <i>et al.</i> , 2015

Tabela 16 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes xilanases GH10 fúngicas

(continuação)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx} (U mg ⁻¹)	K _M (mg mL ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>G. trabeum</i> KACC 43361	Xyl10g	<i>P. pastoris</i> GS115	Xilana (<i>Beechwood</i>)	1,82 (mM min ⁻¹ mg ⁻¹)	101,91 (mM)	1941,43	-	70 °C	pH 4,0- 7,0	Estável abaixo de 50 °C, com 62,5% de atividade residual após 24 h; 85% de perda após 30 min a 70 °C	-	KIM <i>et al.</i> , 2014b
<i>A. terreus</i> <i>BCC129</i>	Xilanase BCC129	<i>P. pastoris</i> KM71	Xilana (<i>Birchwood</i>)	757 ± 14,54	4,8 ± 0,07	-	-	60 °C	pH 5,0	90% após 20 min e 50% após 30 min a 60 °C; completa inativação após 10 min a 70 e 80 °C	>80% de atividade residual após 4h em pH 4,0- 10,0 (a 40 °C)	CHANTASI NGH <i>et al.</i> , 2006
<i>T. leycettanus</i> JCM12802	<i>TLXyn10A</i>	<i>P. pastoris</i> GS115	Xilana (<i>Birchwood</i>)	2542 ± 22	1,01 ± 0,05	-	1626 ± 81	80 °C	pH 4,5	81,7% a 85 °C, 74,8% a 90 °C e 58,2% a 95 °C, após 1h	>80% de atividade residual após 1h em pH 2,0- 8,0 (a 37 °C)	WANG <i>et al.</i> , 2016

Tabela 16 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes xilanases GH10 fúngicas

(continuação)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx} (U mg ⁻¹)	K _M (mg mL ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>M. pulchella</i>	MpXyn10A	<i>A. nidulans</i> A773	Xilana (<i>Birchwood</i>)	82	4,6	748	162,6	80 °C	pH 5,5	Cerca de 85% após 24 h a 65 °C; 80% após 1 h a 70 °C	-	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2014
<i>P. funiculosum</i>	XynD	<i>P. pastoris</i> X-33	LVAX de trigo	-	3,7 ± 0,2	399	108	80 °C	pH 4,0- 5,5	Nenhuma perda após 1 h a 70 °C; perda de cerca de 80% após 10 min a 80 °C	-	LAFOND <i>et al.</i> , 2011
<i>H. insolens Y1</i>	XynW	-	Xilana (<i>Birchwood</i>)	311,8	2,8 (mM)	213,1 (min ⁻¹)	-	70 °C	pH 6,0	Estável após 1h a 50 °C	>90% de atividade residual após 1h em pH 5,0- 10,0 (a 37 °C)	DU <i>et al.</i> , 2013
	XynA	974,4		1,6 (mM)	654,5 (min ⁻¹)	80 °C		pH 6,0				
	XynB	306,8		1,1 (mM)	198,4 (min ⁻¹)	70 °C		pH 7,0				
	XynC	287,7		2,1 (mM)	196,1 (min ⁻¹)	70 °C		pH 6,0				

Tabela 16 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes xilanases GH10 fúngicas

(continuação)

Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx} (U mg ⁻¹)	K _M (mg mL ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>Bispora</i> sp. MEY-1	XYL10C	<i>P. pastoris</i> GS115	Xilana de aveia (<i>spelt</i>)	23728	0,98	-	-	85 °C	pH 4,5- 5,0	Nenhuma perda após 1 h a 80 °C (t _{1/2} = 45 h); >87% de atividade residual após 10 min a 90 °C	>80% de atividade residual após 1h em pH 1,5- 6,0 (a 37 °C)	LUO <i>et al.</i> , 2009
			Xilana (<i>Birchwood</i>)	18744	1,27							
<i>P. chrysosporium</i> RP78	XynA	<i>A. niger</i> N593	Xilana (<i>Birchwood</i>)	-	3,42 ± 0,69	-	-	70 °C	pH 4,5	Nenhuma perda significativa após 30 min a 60 °C; inativação completa a 70 °C	Nenhuma perda significativa após 2 h em pH 3,0-8,0 (a 30 °C)	DECELLE <i>et al.</i> , 2004
	XynC				3,71 ± 0,69							
<i>T. aurantiacus</i> CBMAI 756	Xilanase	-	Arabinoxilana (<i>Birchwood</i>)	-	-	-	-	75 °C	pH 5,0	Cerca de 80% de atividade após 1 h a 40- 70 °C; 18% a 75 °C	Cerca de 90% após 24 h em pH 4,0-10,0; 62% em pH 3,5; 44% em pH 10,5 (a 25 °C)	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2010

Tabela 16 – Comparação entre as propriedades bioquímicas e cinéticas de diferentes xilanases GH10 fúngicas

(conclusão)												
Organismo fonte	Nome da proteína	Sistema de expressão	Substrato	V _{máx} (U mg ⁻¹)	K _M (mg mL ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)	T ótima	pH ótimo	Estabilidade térmica	Estabilidade ao pH	Referência
<i>Trichoderma</i> sp. K9301	EX1	-	Xilana de aveia (<i>spelt</i>)	10,8 x 10 ⁵ (M min ⁻¹ mg ⁻¹)	20,0 (mM)	12,8 x 10 ⁶	6.41 x 10 ⁵ (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	70 °C	pH 5,5	>50% de atividade residual após 48 h a 50 e 60 °C	>80% após 1 h em pH 4,0-9,0 (a T ambiente)	CHEN <i>et al.</i> , 2009
			Xilana (<i>Beechwood</i>)	7,14 x 10 ⁵ (M min ⁻¹ mg ⁻¹)	4,47 (mM)	8,47 x 10 ⁶	19 x 10 ⁵ (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)					
			Xilana (<i>Birchwood</i>)	7,94 x 10 ⁵ (M min ⁻¹ mg ⁻¹)	8,87 (mM)	9,41 x 10 ⁶	10,6 x 10 ⁵ (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)					
<i>A. nidulans</i> KK-99	Xilanase	-	Xilana (<i>Birchwood</i>)	-	-	-	-	55 °C	pH 8,0	-	>80% após 1 h em pH 4,0-9,5 (a 55 °C)	TANEJA <i>et al.</i> , 2002

^a Parâmetros cinéticos determinados a 50 °C
^b Parâmetros cinéticos determinados a 80 °C

Diferentes métodos espectroscópicos podem ser usados para caracterizar a estrutura secundária de enzimas e suas alterações conformacionais sob diferentes condições, fornecendo informações valiosas sobre suas propriedades (ARIAEENEJAD *et al.*, 2019; KISHORE *et al.*, 2012).

Nesse contexto, foram realizadas análises estruturais por dicroísmo circular (DC) e espectroscopia de fluorescência (ITFE) da Af-XYLA, após submeter essa enzima a diferentes temperaturas durante 30 minutos (Figura 40). Os resultados obtidos corroboraram os apresentados anteriormente: após 30 minutos de pré-incubação a 40-60 °C, as atividades residuais foram superiores a 70%; a 70 °C houve uma perda de metade da atividade inicial; a 80 °C e 90 °C, a enzima tornou-se praticamente inativa, com menos de 5% de atividade residual. De fato, como pode ser observado na Figura 40a, o espectro da enzima passou a apresentar alterações mais acentuadas a partir da pré-incubação a 70 °C, indicando que houve uma transição estrutural. O pico máximo em 190 nm e os picos mínimos em 208 e 222 nm diminuíram, apontando para uma redução no conteúdo de α -hélices; ademais, o espectro foi deslocado para 200 nm, sugerindo que estava ocorrendo um processo de desnaturação (BANERJEE & SHEET, 2017; CROOKS *et al.*, 2011; WALLACE & JANES, 2009).

Mais especificamente, de acordo com as predições realizadas no *software* BeStSel a partir dos espectros obtidos para a Af-XYLA pré-incubada nas diferentes temperaturas, o conteúdo de α -hélices passou de 29,1% (25 °C) para 17,2% (70 °C), 14,2% (80 °C) e 11,9% (90 °C); ao mesmo tempo, houve um aumento nos percentuais de folhas β paralelas, voltas e estruturas desordenadas; por fim, a composição de folhas β antiparalelas não sofreu nenhuma alteração significativa (Tabela 17).

Figura 40 – Análises estruturais da *Af*-XYLA por dicroísmo circular (DC) e espectroscopia de fluorescência (ITFE) após pré-incubação da enzima em diferentes temperaturas

Espectros de a) DC e c) ITFE obtidos após a incubação da *Af*-XYLA durante 30 minutos na faixa de temperatura de 25 a 90 °C. b) Valores de elipticidade em 205 nm x Temperatura. d) Valores de comprimento de onda máximo x Temperatura. Em b) e d) os valores de T_m foram determinados através da derivada primeira dos respectivos gráficos.

Tabela 17 – Estimativa das estruturas secundárias da *Af*-XYLA após pré-incubação a 25-90 °C por 30 minutos

Estruturas	25°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
α -hélices	29,1%	25,6%	26,6%	25,3%	17,2%	14,2%	11,9%
Folhas β antiparalelas	22,8%	24,7%	25,2%	25,5%	22,7%	25,2%	26,2%
Folhas β paralelas	0,0%	0,0%	0,0%	1,8%	8,5%	6,2%	5,4%
Voltas	9,1%	9,1%	9,1%	8,9%	11,4%	11,7%	12,8%
Outras/desordenadas	39,0%	40,7%	39,2%	38,5%	40,2%	42,7%	43,7%

Com base nos resultados do DC, também foi possível determinar a T_m (*melting temperature*) da enzima, ou seja, a temperatura em que a proteína encontra-se em um estado de transição reversível entre enovelamento e desnaturação (MIOTTO *et al.*, 2019; PUCCI *et al.*, 2016). O valor de T_m obtido foi 67,7 °C e é possível observar no gráfico da Figura 40b dois estados bem definidos: nativo (25 a 60 °C) e desnaturado (80 a 90 °C). A Af-XYLA apresentou resistência térmica superior à de outras xilanases descritas na literatura, cujos valores de T_m também foram obtidos através de DC. Valores de T_m equivalentes a 58,1 °C, 45,2 °C e 57,4 °C foram obtidos para a Xilanase II de *T. reesei* (LÓPEZ & ESTRADA, 2014), a BCX de *B. circulans* (SHAH *et al.*, 2017) e a XynA de *B. subtilis* (ALPONTI *et al.*, 2016), respectivamente. A elevada termoestabilidade apresentada pela Af-XYLA é decorrente da presença de três pontes dissulfeto em sua estrutura que, provavelmente, contribuem para sua resistência a alterações conformacionais.

Uma vez que há 12 resíduos de triptofano na estrutura da enzima, as alterações conformacionais sofridas por ela sob diferentes condições de temperatura também foram analisadas por espectroscopia de fluorescência. Similarmente ao que foi observado nos resultados de DC, a pré-incubação da enzima na faixa de 25 a 60 °C não provocou mudanças significativas no espectro, indicando que a polaridade dos resíduos de triptofano não foi alterada (Figura 40c). Por outro lado, ao passar de 60 a 70 °C, ficou evidente o deslocamento do pico para a região do vermelho (comprimentos de onda mais longos e menos energéticos), indicando uma maior exposição dos resíduos de triptofano ao solvente polar, o que desencadeou um relaxamento da excitação, evidenciado pela diminuição da energia da emissão de fluorescência (Tabela 18) (JAYME *et al.*, 2018; GHISAIDOOBE & CHUNG, 2014; LAKOWICZ, 2013; SINDREWICZ *et al.*, 2019).

Tabela 18 – Comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) e suas respectivas intensidades de fluorescência

	25 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	333,8	334,4	334,4	336,4	342	342	342,2
Intensidade de fluorescência	550,4	548,8	547,6	562,8	670,6	647,8	600,6

O valor de T_m também foi determinado com base nos dados de ITFE. Conforme pode ser observado na Figura 40d, a Af-XYLA apresentou uma T_m de 61,9 °C, um valor superior aos obtidos (através do mesmo método) para outras xilanases caracterizadas: 56,3 °C, 57,6 °C e 52,3 °C para a Xilanase II de *T. reesei* (LÓPEZ & ESTRADA, 2014), a AuXyn11A de *A. usarii* (ZHANG *et al.*, 2014) e a AoXyn11A de *A. oryzae* (LI *et al.*, 2017).

Durante muitos processos industriais, as enzimas precisam ser expostas a condições extremas e, portanto, uma das propriedades enzimáticas mais fundamentais é a estabilidade a diferentes pHs e altas temperaturas (WANG *et al.*, 2019c; LIU *et al.*, 2015; PELLEGRINI *et al.*, 2015). Nesse sentido, considerando a alta estabilidade da *Af*-XYLA, evidenciada pelos resultados obtidos, a mesma constitui um potencial alvo para aplicações industriais.

4.4.5.2 Efeito de diferentes aditivos e produtos reacionais sobre a atividade da *Af*-XYLA

Avaliou-se os efeitos individuais de diferentes íons e reagentes, adicionados na reação em uma concentração final de 5 mM, sobre a atividade da *Af*-XYLA. Os resultados obtidos, em termos de atividade relativa (%), estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Efeito de íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade da *Af*-XYLA

Aditivo	Atividade Relativa (%)	Aditivo	Atividade Relativa (%)
Nenhum	100,0 ± 0,8	MgSO ₄	100,3 ± 0,3
SDS	44,4 ± 2,9	AgNO ₃	0
Tween 20	128,4 ± 4,2	CoCl ₂	92,4 ± 2,0
EDTA	92,5 ± 1,3	MnCl ₂	100,7 ± 3,0
β-mercaptoetanol	132,5 ± 1,3	(NH ₄) ₂ SO ₄	94,6 ± 0,2
DMSO	104,7 ± 3,8	CaCl ₂	96,4 ± 0,4
Ácido ascórbico	93,0 ± 0,7	KCl	106,1 ± 1,8
CuSO ₄	50,7 ± 1,1	DTT	144,5 ± 3,5
FeSO ₄	53,4 ± 1,7	Triton X-100	111,2 ± 0,2
ZnSO ₄	64,8 ± 0,9	SLS	108,2 ± 1,2

Uma vez que o EDTA é um agente quelante e não afetou a atividade da *Af*-XYLA (92,5%), inferiu-se que essa enzima não é uma metaloproteína (BENHMAD *et al.*, 2016). Ambos os agentes redutores β-mercaptoetanol e DTT estimularam a atividade da *Af*-XYLA (132,5% e 144,5%, respectivamente), indicando que a atividade enzimática é afetada positivamente por grupos sulfidríla de resíduos de cisteína livres (KARNCHANATAT *et al.*, 2008).

Os diferentes surfactantes testados exerceram efeitos distintos sobre a atividade da *Af*-XYLA. Conforme já era esperado, a enzima foi afetada negativamente pelo SDS, apresentando

uma atividade relativa de 44%. Isso ocorreu, provavelmente, porque o SDS interferiu nas regiões hidrofóbicas da enzima, alterando sua estrutura tridimensional, a qual é fundamental para a atividade catalítica (PEREIRA *et al.*, 2017; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2016). Por outro lado, quando exposta ao SLS e a surfactantes não aniônicos (Triton X-100 e Tween 20), sua atividade enzimática foi de 108,2%, 111,2% e 128,4%, respectivamente.

A presença dos íons K^+ , NH_4^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} não surtiu efeito sobre a atividade da Af-XYLA, enquanto os íons Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} provocaram redução da atividade enzimática para 50,7%, 64,8% e 53,4%, respectivamente. Íons cúpricos já são conhecidos por seu forte efeito inibidor sobre xilanases. Eles catalisam a auto-oxidação de cisteínas, levando à formação de pontes dissulfeto intra- ou intermoleculares ou à formação de ácido sulfênico (Cys-SOH) (CHEN *et al.*, 2019a; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2016; VIEILLE & ZEIKUS, 2001).

Cátions bivalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} podem atuar como ativadores ao auxiliarem na estabilização do complexo enzima-substrato de algumas xilanases GH10 (HAQ & AKRAM, 2019; LI *et al.*, 2019b; LIEW *et al.*, 2019). Por exemplo, a adição de Ca^{2+} 2 mM ou Mg^{2+} 5 mM aumentou a atividade da XynBCA de *Caldicoprobacter algeriensis* (atividade relativa > 120%) (MHIRI *et al.*, 2020). Similarmente, o Ca^{2+} melhorou substancialmente ambas estabilidade e atividade (~ 450%) da Xyn10A de *Thermotoga thermarum* (SHI *et al.*, 2013), bem como a atividade (136%) da TnXynB de *Thermotoga naphthophila* RKU-10 (HAQ & AKRAM, 2019). No entanto, esses íons não afetaram a Af-XYLA.

Finalmente, a adição de Ag^+ inibiu completamente a enzima. Em teoria, a inibição de enzimas por metais pesados, tais como Ag^+ e Hg^+ , ocorre devido à forte afinidade desses íons por grupos reativos presentes na estrutura enzimática, como $-SH$, $-CONH_2$, $-NH_2$, $-COOH$ e PO_4 (LIEW *et al.*, 2019; MELEIRO *et al.*, 2018; NARRA *et al.*, 2014).

À medida que a hidrólise da lignocelulose prossegue, são liberadas quantidades crescentes de compostos originados da sua degradação. Esses compostos se acumulam no meio reacional, podendo afetar a eficiência catalítica de xilanases e outras CAZymes (CHEN *et al.*, 2019b). Particularmente, produtos gerados a partir das atividades de xilanases e celulasas (por exemplo: xilose, xilitol, glicose e celobiose) e da fermentação dos açúcares glicose e xilose (etanol) podem inibir a ação de hidrolases, dificultando o alcance de altos rendimentos finais a um custo reduzido (ZOU *et al.*, 2021; MAULANA HIDAYATULLAH *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2019b; MELEIRO *et al.*, 2018). Desse modo, a tolerância à inibição por esses produtos reacionais é essencial para uma aplicação eficiente e econômica de enzimas em processos industriais envolvendo a conversão de biomassas (MELEIRO *et al.*, 2018).

Nesse sentido, investigar os efeitos dos produtos finais D-xilose, D-glicose e etanol sobre a atividade da *Af*-XYLA durante a degradação de xilana seria um passo crucial para uma caracterização completa das propriedades dessa enzima. Para tanto, concentrações crescentes dos monossacarídeos mencionados acima (10-250 mM) e de etanol (0,5-50% (v/v)) foram adicionadas, individualmente, às reações; as atividades relativas na presença desses aditivos foram mensuradas com base na atividade da reação controle (Figura 41).

Observou-se que ambas xilose e glicose, na concentração final de 10 mM, inibiram sutilmente a atividade da xilanase recombinante em aproximadamente 10%. Esse foi o único declínio observado, não ocorrendo mais reduções na atividade da *Af*-XYLA, mesmo na presença de concentrações superiores dos açúcares (25-250 mM) (Figura 41a). A adição de etanol afetou mais drasticamente a atividade da *Af*-XYLA (Figura 41b). Na presença de 1% desse reagente, nenhum efeito foi constatado; 10% de etanol ocasionou uma perda de aproximadamente 27% da atividade máxima; e a atividade da *Af*-XYLA foi reduzida a 34 e 7%, respectivamente, nos meios reacionais contendo 25 e 50% de etanol. HAQ & AKRAM (2019) reportaram uma xilanase GH10 de *Thermotoga naphthophila* RKU-10A (TnXynB) mais resistente a esse álcool, a qual exibiu > 45% de atividade na presença de 50% (v/v) do mesmo (HAQ & AKRAM, 2019). Não obstante, a *Af*-XYLA foi mais tolerante a etanol em comparação às enzimas Xyn11- 1 (WANG *et al.*, 2017) e XynAHJ3 (ZHOU *et al.*, 2012), as quais apresentaram atividades relativas de 59,8% e 44,2%, respectivamente, na presença de 10% do reagente.

Figura 41 – Efeito dos açúcares glicose e xilose (a) e de etanol (b) sobre a atividade da *Af*-XYLA

As barras de erros representam os desvios padrões (n = 3).

4.4.5.3 Avaliação da especificidade da *Af*-XYLA por diferentes substratos e determinação dos seus parâmetros cinéticos

Ao investigar a especificidade por outros substratos, além da xilana, nenhuma atividade foi detectada (Tabela 20). De fato, uma grande parte das xilanases GH10 descritas na literatura também não exibiu atividade considerável sobre substratos celulósicos (WANG *et al.*, 2019c; CHANG *et al.*, 2017; INOUE *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2009). Essa ausência de atividade celulolítica faz da *Af*-XYLA um candidato promissor para aplicação no processo de biobranqueamento da polpa de celulose para fabricação de papel (CHANG *et al.*, 2017).

Tabela 20 – Atividades relativas (%) da *Af*-XYLA sobre diferentes substratos

Substrato	Atividade Relativa (%)
Xilana	100,0 ± 0,4
Xiloglucana	3,1 ± 0,06
CMC	ND
Avicel	ND
ND: Não detectado	

Ademais, a enzima recombinante de *A. fumigatus* foi substancialmente ativa sobre xilana, conforme evidenciado pelos parâmetros cinéticos obtidos e apresentados na Tabela 21. A 50 °C, uma temperatura comumente utilizada nas biorrefinarias durante a sacarificação de biomassas pelos coquetéis enzimáticos (MOHD AZHAR *et al.*, 2017), os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_M foram $35756 \pm 1279 \text{ U mg}^{-1}$ e $1,62 \pm 0,19 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente. Quando as reações enzimáticas foram conduzidas a 80 °C – temperatura ótima da enzima – a $V_{\text{máx}}$ foi ainda maior ($88082 \pm 2639 \text{ U mg}^{-1}$) e o valor de K_M foi $4,09 \pm 0,39 \text{ mg mL}^{-1}$. Atualmente, apenas a xilanase XYL10C de *Bispora* sp. MEY-1 (LUO *et al.*, 2009) apresentou constantes cinéticas da mesma ordem de magnitude que a *Af*-XYLA. Ainda assim, seus valores de $V_{\text{máx}}$ (23728 U mg^{-1} para Xilana de aveia (*spelt*) e 18744 U mg^{-1} para Xilana (*birchwood*) são muito inferiores aos obtidos para a xilanase recombinante de *A. fumigatus*. Os valores baixos de K_M determinados para a *Af*-XYLA indicam que pequenas quantidades de substrato são necessárias para saturar o sítio ativo da enzima. Por outro lado, os valores altos do raio k_{cat}/K_M destacam sua notável eficiência catalítica na degradação de xilana (UDAY *et al.*, 2017).

A estabilidade a condições operacionais e o desempenho catalítico são as características mais importantes a serem consideradas durante a seleção de um biocatalisador para propósitos industriais (UDAY *et al.*, 2017). Assim, baseado em todos os resultados apresentados até o momento, não há dúvidas de que a *Af*-XYLA possui muito potencial para tais aplicações. Entretanto, para superar a barreira imposta pela estrutura recalcitrante da lignocelulose e atingir a degradação completa da mesma, as enzimas precisam ser capazes de atuar em sinergia umas com as outras (BERNARDI *et al.*, 2021b; SONG *et al.*, 2016).

Tabela 21 – Parâmetros cinéticos obtidos para a Af-XYLA sobre o substrato xilana a 50 e 80 °C

Temperatura (°C)	K _M (mg mL ⁻¹)	V _{máx} (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)
50	1,62 ± 0,19	35756 ± 1279	25039	15456
80	4,09 ± 0,39	88082 ± 2639	61682	15081

4.4.6 Otimização de alguns dos principais parâmetros envolvidos na sacarificação enzimática visando melhores rendimentos de açúcares

Nessa busca para elucidar as propriedades da Af-XYLA, tão importante quanto definir as condições reacionais ótimas e a influência de diferentes aditivos sobre a atividade dessa enzima, seria investigar sua capacidade de atuar sobre substratos lignocelulósicos em sinergia com outras CAZymes. A hidrólise enzimática é uma etapa fundamental no processamento da lignocelulose para a obtenção de bioprodutos e bioenergia. O desempenho das enzimas nesse processo depende de vários fatores operacionais, incluindo carga enzimática, pH, temperatura, tempo de reação e concentrações de substrato e surfactante. Muitos pesquisadores, com o objetivo de melhorar as taxas e rendimentos de reação, aplicaram métodos estatísticos na otimização de tais fatores e obtiveram sucesso (BEN TAHER *et al.*, 2017; DAS *et al.*, 2015; PANDIYAN *et al.*, 2014; SAYED JAMALUDIN *et al.*, 2013; VAN DYK & PLETSCHKE *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2009).

A aplicação de xilanases durante a sacarificação de biomassas pré-tratadas melhora os rendimentos de açúcar: essas enzimas solubilizam a xilana, aumentando a acessibilidade das celulasas à celulose e, desse modo, a eficiência geral do processo (CHEN *et al.*, 2019b; UDAY *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2009). Além disso, foi observado anteriormente que a adição de Tween 20 afeta positivamente a atividade da Af-XYLA. De fato, a adição de surfactantes beneficia a sacarificação de biomassas e, portanto, tem sido um fator-alvo em estudos de otimização por DoE (Design of Experiments) (BEN TAHER *et al.*, 2017; DAS *et al.*, 2015; NORATIQA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2009).

Nesse sentido, aplicou-se um DCCR 2³ para determinar os valores ótimos de concentração de Af-XYLA (μg/g substrato), Celluclast® 1.5L (FPU/g substrato) e Tween 20 (% v/v) para uma máxima liberação de açúcares redutores nas reações de hidrólise de SEB e SDB.

As matrizes de delineamento consistiram em 19 experimentos, com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 5 repetições no ponto central (0) (Tabela 22).

Tabela 22 – Matriz do DCCR 2³ e valores experimentais para a otimização das hidrólises de SEB e SDB

Ensaio	A- Tween 20 (% v/v)	B-Celluclast® 1.5L (FPU/g)	C- Af-XYLA (µg/g)	Açúcares redutores (%)	
				Hidrólise de SEB	Hidrólise de SDB
1	-1	-1	-1	2,99	19,42
2	1	-1	-1	4,36	21,78
3	-1	1	-1	4,43	32,87
4	1	1	-1	5,79	28,61
5	-1	-1	1	3,21	23,34
6	1	-1	1	4,66	24,31
7	-1	1	1	5,11	35,36
8	1	1	1	6,49	39,43
9	-1,68	0	0	2,20	26,90
10	1,68	0	0	5,52	27,91
11	0	-1,68	0	3,02	16,67
12	0	1,68	0	5,69	36,29
13	0	0	-1,68	1,56	6,97
14	0	0	1,68	5,74	28,65
15	0	0	0	5,27	29,07
16	0	0	0	5,57	31,75
17	0	0	0	5,75	29,50
18	0	0	0	5,75	28,29
19	0	0	0	5,78	28,49

4.4.6.1 Otimização da hidrólise de SEB

Uma vez realizados os experimentos acima, procedeu-se com as análises no *software* STATISTICA 12. O polinômio quadrático que representa o rendimento de açúcares redutores (Y), obtido a partir da hidrólise de SEB, em função das 3 variáveis independentes (A, B e C) está apresentado na equação (4):

$$Y = 5.554868 + 0.816200 A + 0.811017 B + 0.652783 C - 0.008725 AB + 0.012602 AC + 0,109543 BC - 0.444636 A^2 - 0,268779 B^2 - 0,520199 C^2 \quad (4)$$

O diagrama de Pareto é um recurso gráfico que possibilita visualizar com clareza os efeitos de cada parâmetro individualmente, bem como de suas interações (Figura 42). A significância dos termos (lineares, quadráticos e interações) do modelo foram checadas através de seus respectivos valores de p (os termos que apresentaram $p < 0,01$ foram considerados significativos). Com base nisso, concluiu-se que os efeitos lineares das 3 variáveis independentes foram positivos e significativos sobre a hidrólise de SEB, indicando que todos eles foram críticos para o sucesso da reação.

Figura 42 – Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados para o rendimento de açúcares redutores (%) a partir da hidrólise de SEB

A significância estatística do modelo matemático foi verificada pelo teste F de Fisher. As Análises de Variância (ANOVA) realizadas estão apresentadas na Tabela 23. O ajuste do modelo foi verificado pelo coeficiente de determinação ($R^2 > 0,75$ atesta a aptidão do modelo) (FERREIRA *et al.*, 2009).

Tabela 23 – ANOVA do modelo ajustado de segunda-ordem que descreve a liberação de açúcares redutores a partir de SEB como uma função de 3 variáveis independentes

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F calculado	F tabelado ($\alpha = 0,01$)
Regressão	5	28,01391	5,602782	9,9482929	5,064
Resíduo	12	6,75828	0,5631903		
Falta de ajuste	9	6,59535	0,732817	13,4931	27,345
Erro puro	3	0,16293	0,054310		
Total	17	34,77219			

 $R^2 = 0,81$
 R^2 ajustado = 0,72

Conforme evidenciado pelo teste F , a regressão foi significativa (ou seja, apresentou um valor de F calculado $> F$ tabelado), enquanto a falta de ajuste não foi (F calculado $< F$ tabelado). Tais resultados estatísticos garantem que o modelo é adequado para prever os percentuais de açúcares redutores liberados sob quaisquer combinações entre as variáveis.

A Figura 43 a seguir representa os gráficos de superfície de resposta de 2 variáveis independentes; as variáveis remanescentes foram fixadas em seus respectivos níveis zero. Foi predito que a resposta máxima (6,7% ou 67 mg g⁻¹) poderia ser atingida sob as seguintes condições: 3,75 µg g⁻¹ de *Af*-XYLA, 1,8 FPU g⁻¹ de Celluclast®1.5L, e 0,75% (v/v) de Tween 20. Essa predição foi validada após a realização da hidrólise, em quadruplicata, sob os valores ótimos determinados estatisticamente para os parâmetros, o que rendeu uma resposta real de 7,1% (71 mg g⁻¹).

Figura 43 – Gráficos de superfície de resposta 3D mostrando os efeitos de a) Celluclast®1.5L e Tween 20, b) *Af*-XYLA e Tween 20 e c) *Af*-XYLA e Celluclast®1.5L sobre a produção de açúcares redutores a partir de SEB

a

b

c

As variáveis remanescentes foram fixadas em seus respectivos níveis 0.

4.4.6.2 Otimização da hidrólise de SDB

O polinômio quadrático que descreve a relação entre as 3 variáveis independentes (A, B e C) e o rendimento de açúcares redutores (Y) obtido a partir da hidrólise de SDB, está apresentado na equação (5):

$$Y = 29,19930 + 0,35432 A + 5,89137 B + 4,11533 C - 0,44108 AB + 0,86762 AC + 0,85793 BC + 0,28154 A^2 - 0,04819 B^2 - 3,11881 C^2 \quad (5)$$

O diagrama de Pareto apresentado na Figura 44 permite que se tenha uma visão melhor dos efeitos dos parâmetros. Ambas as concentrações de xilanase e Celluclast® 1.5L exerceram efeitos lineares positivos e significativos sobre a resposta. Por outro lado, diferente do que foi observado para SEB, a adição de Tween 20 não afetou a hidrólise de SDB. O Tween 20 auxilia na hidrólise da lignocelulose devido à sua habilidade de ocupar as regiões hidrofóbicas presentes na superfície da lignina, diminuindo assim a adsorção não produtiva de celulasas a esse polímero aromático (LIN *et al.*, 2019 FERREIRA *et al.*, 2009). Assim, considerando que o SDB resultou de um pré-tratamento químico que removeu sua fração de lignina, não surpreende que o Tween 20 não tenha apresentado nenhum efeito sobre a degradação enzimática dessa biomassa. Uma comparação entre as composições de SEB e SDB é fornecida na Tabela 24.

Tabela 24 – Composição lignocelulósica de SEB e SDB

Biomassa	Pré-tratamento	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
SEB	Explosão a vapor	47,5	9,0	34,3	de GOUVÊA <i>et al.</i> , 2018
SDB	Clorito de sódio/Ácido acético	47,9	24,4	5,4	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2013

Figura 44 – Diagrama de Pareto dos Efeitos Padronizados para o rendimento de açúcares redutores (%) a partir da hidrólise de SDB

Os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela 25. Após a realização do teste F , o modelo matemático provou ser significativo e preditivo. A Figura 45 exibe o gráfico de superfície de resposta que relaciona os dois fatores significativos (concentrações de *Af*-XYLA e Celluclast®1.5L). Similarmente ao que foi predito para SEB, a resposta máxima (40,5% ou 405 mg g⁻¹) poderia ser alcançada com 3,75 µg g⁻¹ de xilanase e 1,8 FPU g⁻¹ de coquetel. Para atestar a validade do método, realizou-se a hidrólise de SDB com os valores ótimos de cargas enzimáticas mencionados acima. Obteve-se um percentual de açúcares redutores equivalente a 37,5% (375 mg g⁻¹), o que foi considerado um resultado de acordo com o valor previsto.

Tabela 25 – ANOVA do modelo ajustado de segunda-ordem que descreve a liberação de açúcares redutores a partir de SDB como uma função de 3 variáveis independentes

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F calculado	F tabelado ($\alpha = 0,01$)
Regressão	3	848,82265	282,94088	29,09564	5,292
Resíduo	16	155,59218	9,7245115		
Falta de ajuste	11	147,769	13,4336	8,5859	9,963
Erro puro	5	7,823	1,5646		
Total	19	1004,415			

$R^2 = 0,85$

R^2 ajustado = 0,82

Figura 45 – Gráfico de superfície de resposta 3D mostrando os efeitos de Celluclast®1.5L e Af-XYLA sobre a produção de açúcares redutores a partir de SDB

A variável Tween 20 foi fixada em seu nível 0.

4.4.7 Desempenho da Af-XYLA associada ao coquetel Celluclast®1.5L durante a sacarificação de SEB e SDB

A associação entre celulasas e xilanasas tem demonstrado ser uma estratégia mais efetiva para melhorar a sacarificação de inúmeras biomassas contendo xilana, quando comparada a estratégias que visam o aumento na quantidade de celulasas no meio reacional (CHEN *et al.*, 2019b; SONG *et al.*, 2016). Nesse sentido, avaliou-se o sinergismo entre a Af-XYLA e o Celluclast®1.5L durante a despolimerização de SEB e SDB. As reações foram realizadas a 50 °C e pH 6,0 por 24 e 48 horas, utilizando-se as concentrações ótimas estimadas estatisticamente para a xilanase recombinante (3,75 µg g⁻¹) e para o coquetel Celluclast® 1.5L (1,8 FPU g⁻¹). Tween 20 (0,75% v/v) também foi utilizado nas hidrólises de SEB.

Como pode ser observado na Figura 46, a presença da Af-XYLA nas reações intensificou a liberação de açúcares redutores a partir de ambos os substratos, demonstrando o alto grau de sinergismo entre as enzimas. Para SEB, as hidrólises melhoraram cerca de 155% após 24 e 48 horas (Figura 46a). Para SDB, foram observados aumentos de 305 e 277% após 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 46b). Esses resultados também destacaram os limites impostos pela lignina sobre a recuperação dos açúcares a partir das biomassas, conforme

evidenciado pela magnitude da diferença entre as escalas dos gráficos (BERNAL-LUGO *et al.*, 2019; TIAN *et al.*, 2017).

Figura 46 – Avaliação do sinergismo entre a Af-XYLA e o coquetel Celluclast®1.5L durante as hidrólises de a) SEB e b) SDB

Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS e apresentados como percentuais do rendimento máximo teórico. As barras brancas e pretas correspondem, respectivamente, ao controle (coquetel isolado) e à associação entre coquetel e Af-XYLA. Os dados representam as médias $\pm$ desvios padrões obtidas a partir de 4 réplicas experimentais. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao controle.

Estudos de sinergismo envolvendo celulasas e xilanases têm sido o foco de inúmeros grupos de pesquisa, e muitos trabalhos científicos já estão descritos na literatura. Hu *et al.* (2011b) reportou que a adição da mistura comercial de xilanases Multifect (Genencor) aumentou de 45% para 87% o rendimento e a extensão da hidrólise de palha de milho pré-tratada a vapor pelo coquetel Celluclast®1.5L. Similarmente, a ação cooperativa entre a xilanase de *Bacillus* sp. (XynA) e o Celluclast®1.5L durante a hidrólise de palha de milho pré-tratada resultou em uma maior produção de açúcares redutores quando comparada à reação realizada somente com as celulasas. Mais especificamente, foram obtidos os respectivos aumentos de 48,7% e 77,6% com a adição de 2 e 4 U_{BirWX} de XynA (WANG *et al.*, 2019c). Ambas as xilanases MYCTH_56237 e MYCTH_49824, do fungo *M. thermophila*, também cooperaram sinergicamente com o Celluclast®1.5L, promovendo aumentos na hidrólise de palha de milho pré-tratada de 30% para 50,3 e 55,6%, respectivamente (BASIT *et al.*, 2018). Da mesma forma, Song *et al.* (2016) observou que o co-tratamento com xilanase-celulase melhorou em 133, 164 e 545%, respectivamente, as hidrólises de sabugo de milho, palha de milho e palha de arroz. Juntos, esses resultados ressaltaram o potencial de se associar enzimas como estratégia para melhorar o teor de açúcares liberados a partir da sacarificação de biomassas.

5 Conclusões

5 CONCLUSÕES

Duas celulases (endoglucanase GH7 e celobiohidrolase GH6) e uma xilanase GH10 de *A. fumigatus* foram investigadas quanto aos seus potenciais para aplicações biotecnológicas. Para tanto, após a clonagem dos genes *Af-egl7*, *Afcel6A* e *Af-xylA* nos vetores de expressão apropriados, as três enzimas foram heterologamente expressas com sucesso em *E. coli* (somente *Af-EGL7*) e *P. pastoris* (*Af-EGL7*, *AfCel6A* e *Af-XYLA*), e, em seguida, purificadas. Após obtê-las puras e em suas conformações funcionais, deu-se início à caracterização de suas propriedades bioquímicas e cinéticas.

A expressão heteróloga em *E. coli* resultou na obtenção da *Af-EGL7* recombinante intracelularmente na forma de corpos de inclusão. Esses agregados insolúveis tiveram que ser submetidos a etapas de lavagem, desnaturação, solubilização e, por fim, reenovelamento para obter uma endoglucanase funcional. A *Af-EGL7* exibiu atividade máxima em pH 5,0 e 55 °C – condições geralmente utilizadas em processos de sacarificação nas biorrefinarias. Além disso, apresentou elevada estabilidade térmica a 50 °C, retendo 85% de atividade após 48 horas de pré-incubação nessa temperatura. A enzima recombinante também foi estável à presença de praticamente todos os aditivos testados, incluindo Tween 20, que é um surfactante comumente adicionado às reações de hidrólise da lignocelulose nas indústrias. Por fim, ao ser associada com o coquetel comercial Celluclast[®]1.5L durante a degradação de SEB, promoveu aumentos consideráveis na liberação de açúcares redutores, indicando sua alta capacidade de atuar sinergicamente com outras celulases. Contudo, essa enzima não apresentou bons parâmetros de estabilidade em temperaturas e pH mais extremos, e os parâmetros cinéticos foram notavelmente inferiores aos reportados para outras endoglucanases fúngicas da mesma família.

Nesse sentido, visando obter um biocatalisador superior, optou-se por expressá-la também no hospedeiro eucarioto *P. pastoris*. De fato, o correto processamento e enovelamento da *Af-EGL7* resultou em uma enzima muito mais estável e ativa em comparação à expressa em bactéria, e, até mesmo, frente a outras endoglucanases descritas na literatura. Mais especificamente, a *Af-EGL7* exibiu 100% de atividade após 72 horas de pré-incubação na faixa de pH de 3,0 a 8,0, e resistiu a temperaturas extremas, retendo cerca de 30% de sua atividade após 1 hora a 90 °C. Quanto à eficiência catalítica, a enzima expressa em levedura exibiu parâmetros mais de 1000 vezes superiores aos obtidos após a expressão em *E. coli*.

Os valores de pH e temperatura ótimos obtidos para a *AfCel6A* foram similares aos da *Af-EGL7*, equivalentes a 5,5-6,0 e 55-60 °C, respectivamente. Além disso, a celobiohidrolase recombinante apresentou atividade residual de aproximadamente 50% após 72 horas a 50 °C, e

suportou uma pré-incubação de 30 minutos a 90 °C, restando cerca de 30% de atividade. Uma estabilidade considerável a diferentes condições de pH também foi observada, uma vez que a enzima reteve mais de 70% de sua atividade inicial após ser submetida por 72 horas na faixa de pH de 3,0 a 10,0. Ainda, a adição de Tween 20 e glicose ao meio reacional não provocou perdas significativas na atividade da *AfCel6A* e, mesmo na presença de 250 mM desse monossacarídeo, a enzima exibiu 87% de atividade. A *AfCel6A* também exibiu um elevado grau de sinergismo com o coquetel Celluclast®1.5L e com a *Af-EGL7* durante a degradação de CMC e materiais lignocelulósicos, o que resultou em rendimentos de hidrólise muito superiores em comparação ao controle.

A *Af-XYLA* atingiu sua maior atividade na faixa de pH de 5,0 a 7,0, mas foi capaz de atuar com 80% de seu potencial máximo em pH 4,0 e 8,0. Com relação à temperatura, diferente das duas celulasas recombinantes, a *Af-XYLA* teve um melhor desempenho a 80 °C. Contudo, mesmo a 50 °C – uma condição bem distante da sua temperatura ótima – a xilanase recombinante exibiu uma notável eficiência catalítica, e, portanto, poderia ser associada ao coquetel Celluclast®1.5L, e até mesmo a ambas *Af-EGL7* e *AfCel6A*, em processos de sacarificação de biomassas. De fato, a ação sinérgica entre a *Af-XYLA* e as celulasas comerciais intensificou substancialmente a liberação de açúcares redutores a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. A atividade da *Af-XYLA* também não foi afetada por Tween 20, e a presença de glicose e xilose em concentração final de 250 mM provocou uma perda de apenas 10% na mesma. Por fim, a *Af-XYLA* foi consideravelmente estável a diferentes condições de pH e temperatura. Após 72 horas de pré-incubação em pH 4,0-8,0, exibiu 80% de atividade residual, enquanto que, ao ser submetida a 50 °C durante esse mesmo intervalo de tempo reteve 60% de sua atividade máxima.

A estabilidade a diferentes condições operacionais e aditivos, elevada eficiência catalítica e capacidade de atuar em sinergia com outras CAZymes são alguns dos principais requisitos que uma enzima deve satisfazer para ser adequada à aplicação em diferentes processos industriais. Nesse sentido, os resultados obtidos nesse projeto, e aqui apresentados, apontaram as enzimas recombinantes *Af-EGL7*, *AfCel6A* e *Af-XYLA* como biocatalisadores robustos para aplicações biotecnológicas, podendo ser utilizadas como suplementos aos coquetéis comerciais, ou, até mesmo, na confecção de novos coquetéis mais eficientes, o que pode contribuir para a consolidação do etanol 2G e outros bioprodutos no mercado brasileiro.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; PARK, H.; CHOI, O.; SINDHU, R.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A.; PARK, J. H.; SANG, B. I. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122725, 2020.
- ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; SZE, S. K. Quantitative proteomic study of *Aspergillus fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes. **Journal of Proteomics**, v. 119, p. 154–168, 2015.
- ADSUL, M.; SANDHU, S. K.; SINGHANIA, R. R.; GUPTA, R.; PURI, S. K.; MATHUR, A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109442, 2020.
- AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
- AICH, S. & DATTA, S. Engineering of a highly thermostable endoglucanase from the GH7 family of *Bipolaris sorokiniana* for higher catalytic efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 9, p. 3935–3945, 2020.
- AICH, S.; SINGH, R. K.; KUNDU, P.; PANDEY, S. P.; DATTA, S. Genome-wide characterization of cellulases from the hemi-biotrophic plant pathogen, *Bipolaris sorokiniana*, reveals the presence of a highly stable GH7 endoglucanase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2017.
- AKBARZADEH, A.; POURZARDOSHT, N.; DEHNAVI, E.; RANAEI SIADAT, S. O.; ZAMANI, M. R.; MOTALLEBI, M.; NIKZAD JAMNANI, F.; AGHAEIPOOR, M.; BARSHAN TASHNIZI, M. Disulfide bonds elimination of endoglucanase II from *Trichoderma reesei* by site-directed mutagenesis to improve enzyme activity and thermal stability: An experimental and theoretical approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1572–1580, 2018.
- AKBARZADEH, A.; RANAEI SIADAT, S. O.; MOTALLEBI, M.; ZAMANI, M. R.; BARSHAN TASHNIZI, M.; MOSHTAGHI, S. Characterization and high level expression of acidic endoglucanase in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2253–2265, 2014.
- AKRAM, F.; HAQ, Ikram ul; IMRAN, W.; MUKHTAR, H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. **Renewable Energy**, v. 122, p. 225–238, 2018.
- ALI, N.; ZHANG, Q.; LIU, Z. Y.; LI, F. L.; LU, M.; FANG, X. C. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 455–473, 2020.

ALOKIKA; ANU; KUMAR, A.; KUMAR, V.; SINGH, B. Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 564–582, 2021.

ALPONTI, J. S.; FONSECA MALDONADO, R.; WARD, R. J. Thermostabilization of *Bacillus subtilis* GH11 xylanase by surface charge engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 522–528, 2016.

AMORE, A. *et al.* Distinct roles of N- and O-glycans in cellulase activity and stability. **PNAS**, v. 114, n. 52, p. 13667–13672, 2017.

AN, J.; XIE, Y.; ZHANG, Y.; TIAN, D.; WANG, S.; YANG, G.; FENG, Y. Characterization of a thermostable, specific GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii* with high catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 117, p. 13–20, 2015.

ANBARASAN, S.; JÄNIS, J.; PALOHEIMO, M.; LAITAOJA, M.; VUOLANTO, M.; KARIMÄKI, J.; VAINIOTALO, P.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase produced by *Thermopolyspora flexuosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 356–360, 2010.

ANDLAR, M.; REZIĆ, T.; MARĐETKO, N.; KRACHER, D.; LUDWIG, R.; ŠANTEK, B. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 11, p. 768–778, 2018.

ANDRIĆ, P.; MEYER, A. S.; JENSEN, P. A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 308–324, 2010.

ANTOLINI, E. Lignocellulose, Cellulose and Lignin as Renewable Alternative Fuels for Direct Biomass Fuel Cells. **ChemSusChem**, v. 14, n. 1, p. 189–207, 2021.

ARANTES, V. & SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2010.

ARIAEENEJAD, S.; HOSSEINI, E.; MALEKI, M.; KAVOUSHI, K.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; SALEKDEH, G. H. Identification and characterization of a novel thermostable xylanase from camel rumen metagenome. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1295–1302, 2019.

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.

ATREYA, M. E.; STROBEL, K. L.; CLARK, D. S. Alleviating product inhibition in cellulase enzyme Cel7A. **Biotechnology and Bioengineering**, 2016.

AZIZI, M.; HEMMAT, J.; SEIFATI, S. M.; TORKTAZ, I.; KARIMI, S. Characterization of a thermostable endoglucanase produced by *Isoptericola variabilis* sp. IDAH9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1225–1234, 2015.

BANERJEE, R. & SHEET, T. Ratio of ellipticities between 192 and 208 nm (R1): An effective electronic circular dichroism parameter for characterization of the helical components of proteins and peptides. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 85, n. 11, p. 1975–1982, 2017.

BARAMEE, S.; TEERAVIVATTANAKIT, T.; PHITSUWAN, P.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPA KOON, C.; KOSUGI, A.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. A novel GH6 cellobiohydrolase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 and its synergistic action on cellulose degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 1175–1188, 2017.

BASIT, A.; LIU, J.; MIAO, T.; ZHENG, F.; RAHIM, K.; LOU, H.; JIANG, W. Characterization of two endo- β -1, 4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

BATALHA, L. A. R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H. m.; COLODETTE, J. L.; BORGES GOMES, F. J. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 97–105, 2015.

BEN TAHER, I.; FICKERS, P.; CHNITI, S.; HASSOUNA, M. Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 2, p. 397–406, 2017.

BENHMAD, I.; BOUDABBOUS, M.; YAÏCH, A.; REBAI, M.; GARGOURI, A. A novel neutral, halophile *Stachybotrys microspora*-based endoglucanase active impact on β -glucan. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2016.

BENOIT-GELBER, I.; GRUNTJES, T.; VINCK, A.; VAN VELUW, J. G.; WÖSTEN, H. A. B.; BOEREN, S.; VERVOORT, J. J. M.; DE VRIES, R. P. Mixed colonies of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* cooperatively degrading wheat bran. **Fungal Genetics and Biology**, v. 102, p. 31–37, 2017.

BERNAL-LUGO, I.; JACINTO-HERNANDEZ, C.; GIMENO, M.; CARMINA MONTIEL, C.; RIVERO-CRUZ, F.; VELASCO, O. Highly efficient single-step pretreatment to remove lignin and hemicellulose from softwood. **BioResources**, v. 14, n. 2, p. 3567–3577, 2019.

BERNARDES, A.; PELLEGRINI, V. O. A.; CURTOLO, F.; CAMILO, C. M.; MELLO, B. L.; JOHNS, M. A.; SCOTT, J. L.; GUIMARAES, F. E. C.; POLIKARPOV, I. Carbohydrate binding modules enhance cellulose enzymatic hydrolysis by increasing access of cellulases to the substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 57–68, 2019.

BERNARDI, A. V.; GEROLAMO, L. E.; UYEMURA, S. A.; DINAMARCO, T. M. A thermophilic, pH-tolerant, and highly active GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* boosted pre-treated sugarcane bagasse saccharification by cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113697, 2021a.

BERNARDI, A. V.; GEROLAMO, L. E.; de GOUVÊA, P. F.; YONAMINE, D. K.; PEREIRA, L. M. S.; de OLIVEIRA, A. H. C.; UYEMURA, S. A.; DINAMARCO, T. M. LPMO AfAA9_B

and Cellobiohydrolase AfCel6A from *A. fumigatus* Boost Enzymatic Saccharification Activity of Cellulase Cocktail. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, 276, 2021b.

BERNARDI, A. V.; YONAMINE, D. K.; UYEMURA, S. A.; DINAMARCO, T. M. A Thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 Endoglucanase Over-Expressed in *Pichia pastoris* Stimulates Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2261, 2019.

BERNARDI, A. V.; DE GOUVÊA, P. F.; GEROLAMO, L. E.; YONAMINE, D. K.; BALICO, L. L. L.; UYEMURA, S. A.; DINAMARCO, T. M. Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application. **Protein Expression and Purification**, v. 150, p. 1-11, 2018.

BEZERRA, T. L. & RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 5, p. 634–647, 2016.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355–383, 2000.

BHATWA, A.; WANG, W.; HASSAN, Y. I.; ABRAHAM, N.; LI, X. Z.; ZHOU, T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 1–18, 2021.

BOONVITTHYA, N.; BOZONNET, S.; BURAPATANA, V.; O'DONOHUE, M. J.; CHULALAKSANANUKUL, W. Comparison of the Heterologous Expression of *Trichoderma reesei* Endoglucanase II and Cellobiohydrolase II in the Yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. **Molecular Biotechnology**, v. 54, p. 158–169, 2013.

BORIN, G. P. *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–21, 2017.

BORIN, G. P. *et al.* Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

BORISOVA, A. S. *et al.* Correlation of structure, function and protein dynamics in GH7 cellobiohydrolases from *Trichoderma atroviride*, *T. Reesei* and *T. Harzianum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2018.

BRADY, S. K.; SREELATHA, S.; FENG, Y.; CHUNDAWAT, S. P. S.; LANG, M. J. Cellobiohydrolase 1 from *Trichoderma reesei* degrades cellulose in single cellobiose steps. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–9, 2015.

BRAGA, R. S. & POLETTO, M. Preparation and Characterization of Hemicellulose Films from Sugarcane Bagasse. **Materials**, v. 13, n. 4, p. 941, 2020.

BREYER, W. A. & MATTHEWS, B. W. A structural basis for processivity. **Protein Science**, v. 10, n. 9, p. 1699–1711, 2001.

BRIENZO, M.; FIKIZOLO, S.; BENJAMIN, Y.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renewable Energy**, v. 104, p. 271–280, 2017.

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

BRUM, S. S.; DE OLIVEIRA, L. C. A.; BIANCHI, M. L.; GUERREIRO, M. C.; DE OLIVEIRA, L. K.; CARVALHO, K. T. G. Synthesis of cellulose acetate from the bean straw using N-bromosuccinimide (NBS) as catalyst. **Polímeros**, v. 22, n. 5, p. 447–452, 2012.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

CEREGHINO, J. L. & CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.

CHAHED, H.; BOUMAIZA, M.; EZZINE, A.; MARZOUKI, M. N. Heterologous expression and biochemical characterization of a novel thermostable *Sclerotinia sclerotiorum* GH45 endoglucanase in *Pichia pastoris*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 629–635, 2018.

CHAMPREDA, V. *et al.* Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: From nature to application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 6, p. 637–654, 2019.

CHANDEL, A. K.; ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; CHUNDAWAT, S. Ps; PURI, M.; MEIRELES, M. A. A. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 4, p. 994–1014, 2019.

CHANG, X.; XU, B.; BAI, Y.; LUO, H.; MA, R.; SHI, P.; YAO, B. Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.

CHANTASINGH, D.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V.; KANOKRATANA, P.; EURWILAICHITR, L. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 46, n. 1, p. 143–149, 2006.

CHEN, S.; XIA, Y.; ZHANG, B.; CHEN, H.; CHEN, G.; TANG, S. Disassembly of lignocellulose into cellulose, hemicellulose, and lignin for preparation of porous carbon materials with enhanced performances. **Journal of Hazardous Materials**, v. 408, p. 124956, 2021.

CHEN, X.; XIN, D.; WANG, R.; QIN, Y.; WEN, P.; HOU, X.; ZHANG, J. Factors affecting hydrolytic action of xylanase during pennisetum saccharification: Role of cellulose and its derivatives. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 49–56, 2019a.

CHEN, Z.; ZAKY, A. A.; LIU, Y.; CHEN, Y.; LIU, L.; LI, S.; JIA, Y. Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs. **Protein Expression and Purification**, v. 154, n. 11, p. 91–97, 2019b.

CHEN, H. & FU, X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 468–478, 2016.

CHEN, L. L.; ZHANG, M.; ZHANG, D. H.; CHEN, X. L.; SUN, C. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5230–5236, 2009.

CHETTRI, D.; VERMA, A. K.; VERMA, A. K. Innovations in CAZyme gene diversity and its modification for biorefinery applications. **Biotechnology Reports**, v. 28, 2020.

CHRISTENSEN, S. J.; BERTEL, K.; MØRKEBERG, R.; SPODSBERG, N.; BORCH, K.; WESTH, P. A biochemical comparison of fungal GH6 cellobiohydrolases. **Biochemical Journal** v. 476, p. 2157–2172, 2019.

CHRISTENSEN, S. J.; KARI, J.; BADINO, S. F.; BORCH, K.; WESTH, P. Rate-limiting step and substrate accessibility of cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*. **FEBS Journal**, v. 285, n. 23, p. 4482–4493, 2018.

CHUNG, D. *et al.* Glycosylation Is Vital for Industrial Performance of Hyperactive Cellulases. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 7, n. 5, p. 4792–4800, 2019.

CORTEZ, L. A. B.; BALDASSIN, R.; DE ALMEIDA, E. Energy from sugarcane. In: **Biorefinery, Technology and Perspectives**, p. 117–139, 2020.

CORTEZ, L. A. B.; LEITE, R. C. C.; GOLDEMBERG, J.; SZWARC, A.; FELIPE, M. G. A.; BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: **Blucher**, 2010.

COUTINHO, P. M. *et al.* Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal genetics and Biology**, v. 46 Suppl 1, n. 1, p. S161–S169, 2009.

COUTURIER, M.; FELIU, J.; HAON, M.; NAVARRO, D.; LESAGE-MEESSEN, L.; COUTINHO, P. M.; BERRIN, J. G. A thermostable GH45 endoglucanase from yeast: Impact of its atypical multimodularity on activity. **Microbial Cell Factories**, v. 10, 2011.

CRAGG, S. M. *et al.* Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 29, p. 108–119, 2015.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Bio/technology**, v. 11, n. 8, p. 905–910, 1993.

CROOKS, R. O.; RAO, T.; MASON, J. M. Truncation, randomization, and selection: Generation of a reduced length c-jun antagonist that retains high interaction stability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 29470–29479, 2011.

CULLETON, H.; MCKIE, V.; DE VRIES, R. P. Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from *Aspergillus*? **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 8, p. 884–894, 2013.

CUNHA, J. T.; ROMANÍ, A.; COSTA, C. E.; SÁ-CORREIA, I.; DOMINGUES, L. Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulose-based process conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 159–175, 2019.

CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Effect of a novel method for in-house cellulase production on 2G ethanol yields. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 224–229, 2017.

DALY, P. *et al.* Expression of *Aspergillus niger* CAZymes is determined by compositional changes in wheat straw generated by hydrothermal or ionic liquid pretreatments. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2017.

DAS, S.; BHATTACHARYA, A.; HALDAR, S.; GANGULY, A.; GU, Sai; TING, Y. P.; CHATTERJEE, P. K. Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: Comparison between artificial neural network and response surface methodology. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 3, p. 17–28, 2015.

de AMO, G. S.; BEZERRA-BUSSOLI, C.; DA SILVA, R. R.; KISHI, L. T.; FERREIRA, H.; MARIUTTI, R. B.; ARNI, R. K.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Heterologous expression, purification and biochemical characterization of a new xylanase from *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 798–805, 2019.

de GOUVÊA, P. F.; BERNARDI, A. V.; GEROLAMO, L. E.; DE SOUZA SANTOS, E.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; UYEMURA, S. A.; DINAMARCO, T. M. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 2018.

de PAULA, R. G.; ANTONIÊTO, A. C. C.; RIBEIRO, L. F. C.; SRIVASTAVA, N.; O'DONOVAN, A.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; SILVA, R. N. Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 107347, 2019.

ABUD, A. K. S. & SILVA, C. E. F. Bioethanol in Brazil: Status, Challenges and Perspectives to Improve the Production. In: **Bioethanol Production from Food Crops**, p. 417–443, 2019.

DECELLE, B.; TSANG, A.; STORMS, R. K. Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4- β -xylanases. **Current Genetics**, v. 46, n. 3, p. 166–175, 2004.

DESHPANDE, M. V.; ERIKSSON, K. E.; GÖRAN PETTERSSON, L. An assay for selective determination of exo-1,4,- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. **Analytical Biochemistry**, v. 138, n. 2, p. 481–487, 1984.

dos SANTOS, B. S. L.; GOMES, A. F. S.; FRANCISCON, E. G.; DE OLIVEIRA, J. M.; BAFFI, M. A. Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 903–910, 2015.

dos SANTOS, F. C.; DE OLIVEIRA, M. A. S.; SEIXAS, F. A. V.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. A Novel Cellobiohydrolase I (CBHI) from *Penicillium digitatum*: Production, Purification, and Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, n. 1, p. 257–282, 2020.

DOTSENKO, A. S.; DOTSENKO, G. S.; ROZHKOVA, A. M.; ZOROV, I. N.; SINITSYN, A. P. Rational design and structure insights for thermostability improvement of *Penicillium verruculosum* Cel7A cellobiohydrolase. **Biochimie**, v. 176, p. 103–109, 2020.

DU, J.; ZHANG, X.; LI, X.; ZHAO, J.; LIU, G.; GAO, B.; QU, Y. The cellulose binding region in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I has a higher capacity in improving crystalline cellulose degradation than that of *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 19–25, 2018.

DU, Y.; SHI, P.; HUANG, H.; ZHANG, X.; LUO, H.; WANG, Y.; YAO, B. Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Humicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 161–167, 2013.

EVANGELISTA, D. E.; KADOWAKI, M. A. S.; MELLO, B. L.; POLIKARPOV, I. Biochemical and biophysical characterization of novel GH10 xylanase prospected from a sugar cane bagasse compost-derived microbial consortia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 560–568, 2018.

FAN, G. *et al.* Impact of the disulfide bond on hydrolytic characteristics of a xylanase from *Talaromyces thermophiles* F1208. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1748–1757, 2020.

FANG, H. & XIA, L. Heterologous expression and production of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II in *Pichia pastoris* and the application in the enzymatic hydrolysis of corn stover and rice straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 78, p. 99–109, 2015.

FATMA, S.; HAMEED, A.; NOMAN, M.; AHMED, T.; SOHAIL, I.; SHAHID, M.; TARIQ, M.; TABASSUM, R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for Future. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, n. 2, 2018.

FERREIRA, J. A. & TAHERZADEH, M. J. Improving the economy of lignocellulose-based biorefineries with organosolv pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122695, 2020.

FERREIRA, S.; DUARTE, A. P.; RIBEIRO, M. H. L.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 192–200, 2009.

GABRIEL, R. *et al.* Development of genetic tools for the thermophilic filamentous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2020.

GACIARZ, A.; KHATRI, N. K.; VELEZ-SUBERBIE, M. L.; SAARANEN, M. J.; UCHIDA, Y.; KESHAVARZ-MOORE, E.; RUDDOCK, L. W. Efficient soluble expression of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* in fed-batch fermentations on chemically defined minimal media. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.

GALAGAN, J. E. *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1105–1115, 2005.

GENG, A.; WU, J.; XIE, R.; WANG, H.; WU, Y.; LI, X.; CHANG, F.; SUN, J. Highly thermostable GH51 α -arabinofuranosidase from *Hungateiclostridium clariflavum* DSM 19732. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 3783–3793, 2019.

GHISAIDOOBE, A. B. T. & CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22518–22538, 2014.

GLASGOW, E.; VANDER MEULEN, K.; KUCH, N.; FOX, B. G. Multifunctional cellulases are potent, versatile tools for a renewable bioeconomy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 67, p. 141–148, 2021.

GLASS, N. L.; SCHMOLL, M.; CATE, J. H. D.; CORADETTI, S. Plant Cell Wall Deconstruction by Ascomycete Fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 477–498, 2013.

GOEDEGEBUUR, F. *et al.* Improving the thermal stability of cellobiohydrolase Cel7A from *Hypocrea jecorina* by directed evolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 42, p. 17418–17430, 2017.

GOMES, D.; CUNHA, J.; ZANUSO, E.; TEIXEIRA, J.; DOMINGUES, L. Strategies towards Reduction of Cellulases Consumption: Debottlenecking the Economics of Lignocellulosics Valorization Processes. **Polysaccharides**, v. 2, n. 2, p. 287–310, 2021.

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

GREENBERG, D. M. the Colorimetric Determination of the Serum Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 545–550, 1929.

GRUNO, M.; VÄLJAMÄE, P.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 503–511, 2004.

GUERRA, S. P. S.; DENADAI, M. S.; SAAD, A. L. M.; SPADIM, E. R.; da COSTA, M. X. R. Sugarcane: biorefinery, technology, and perspectives. In: **Biorefinery, Technology and Perspectives**, p. 49-65, 2020

GUILLÉN, D.; SÁNCHEZ, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R. Carbohydrate-binding domains: Multiplicity of biological roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1241–1249, 2010.

HAMILTON, S. R. & GERNGROSS, T. U. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 387–392, 2007.

HAN, N.; MA, Y.; MU, Y.; TANG, X.; LI, J.; HUANG, Z. Enhancing thermal tolerance of a fungal GH11 xylanase guided by B-factor analysis and multiple sequence alignment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 131, 2019.

HAN, C.; LI, W.; HUA, C.; SUN, F.; BI, P.; WANG, Q. Enhancement of catalytic activity and thermostability of a thermostable cellobiohydrolase from *Chaetomium thermophilum* by site-directed mutagenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 691–697, 2018.

HAQ, Ikram ul. & AKRAM, F. Insight into kinetics and thermodynamics of a novel hyperstable GH family 10 endo-1,4- β -xylanase (TnXynB) with broad substrates specificity cloned from *Thermotoga naphthophila* RKU-10T. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 127, p. 32–42, 2019.

HASANOV, I.; RAUD, M.; KIKAS, T. The role of ionic liquids in the lignin separation from lignocellulosic biomass. **Energies**, v. 13, n. 18, p. 1–24, 2020.

HASUNUMA, T.; OKAZAKI, F.; OKAI, N.; HARA, K. Y.; ISHII, J.; KONDO, A. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513–522, 2013.

HE, J.; TANG, F.; CHEN, D.; YU, B.; LUO, Y.; ZHENG, P.; MAO, X.; YU, J.; YU, F. Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from *Trichoderma reesei*. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2019.

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.

HOLCK, J. *et al.* A carbohydrate-binding family 48 module enables feruloyl esterase action on polymeric arabinoxylan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 46, p. 17339–17353, 2019.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 45, 2012.

HORTA, M. A. C. *et al.* Transcriptome profile of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 induced by sugarcane bagasse. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–17, 2014.

HOSSEINI KOUPAIE, E.; DAHADHA, S.; BAZYAR LAKEH, A. A.; AZIZI, A.; ELBESHISHY, E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced

biomethane production-A review. **Journal of Environmental Management**, v. 233, p. 774–784, 2019.

HU, H. L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B. S.; WÖSTEN, H. A. B.; GU, J. D.; DE VRIES, R. P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 248–252, 2011a.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: Is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, 2011b.

HU, J. & SADDLER, J. N. Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the deconstruction of pretreated biomass? **Biomass and Bioenergy**, v. 110, p. 13–16, 2018.

HUA, C.; LI, W.; HAN, W.; WANG, Q.; BI, P.; HAN, C.; ZHU, L. Characterization of a novel thermostable GH7 endoglucanase from *Chaetomium thermophilum* capable of xylan hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 342–349, 2018.

INOUE, H.; KISHISHITA, S.; KUMAGAI, A.; KATAOKA, M.; FUJII, T.; ISHIKAWA, K. Contribution of a family 1 carbohydrate-binding module in thermostable glycoside hydrolase 10 xylanase from *Talaromyces cellulolyticus* toward synergistic enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 3–11, 2015.

JAIN, K. K.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, K. N.; KUHAD, R. C. Functional Expression of a Thermostable Endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* RCKK in *Pichia pastoris* X-33 and Its Characterization. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 10, p. 736–748, 2018.

JAYME, C. C.; CALORI, I. R.; CUNHA, E. M. F.; TEDESCO, A. C. Evaluation of aluminum phthalocyanine chloride and DNA interactions for the design of an advanced drug delivery system in photodynamic therapy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 201, p. 242–248, 2018.

JOSHI, N.; SHARMA, M.; SINGH, S. P. Characterization of a novel xylanase from an extreme temperature hot spring metagenome for xylooligosaccharide production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 11, p. 4889–4901, 2020.

JUNG, H.; YOON, H. G.; PARK, W.; CHOI, C.; WILSON, D. B.; SHIN, D. H.; KIM, Y. J. Effect of sodium hydroxide treatment of bacterial cellulose on cellulase activity. **Cellulose**, v. 15, n. 3, p. 465–471, 2008.

KADOWAKI, M. A. S.; HIGASI, P.; DE GODOY, M. O.; PRADE, R. A.; POLIKARPOV, I. Biochemical and structural insights into a thermostable cellobiohydrolase from *Myceliophthora thermophila*. **FEBS Journal**, v. 285, n. 3, p. 559–579, 2018.

KARIM, A.; UL QADER, S. A.; NAZWAZ, A.; AMAN, A. Immobilization of Endo (1→4) β -D-Glucanase from *Bacillus Licheniformis* KIBGE-IB2 Using Agar-Agar as Support for Continuous Use. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 409–414, 2014.

KARNAOURI, A.; MURALEEDHARAN, M. N.; DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; ROVA, U.; SANDGREN, M.; CHRISTAKOPOULOS, P. Recombinant expression of thermostable processive MtEG5 endoglucanase and its synergism with MtLPMO from *Myceliophthora thermophila* during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

KARNAOURI, A. C.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 231–242, 2014.

KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; PIAPUKIEW, J.; WHALLEY, A. J. S.; REYNOLDS, C. D.; GADD, G. M.; SIHANONTH, P. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 5, p. 404–413, 2008.

KHAIRE, K. C.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Bioconversion of sugarcane tops to bioethanol and other value added products: An overview. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 4, p. 54–68, 2021.

KHALILI GHADIKOLAEI, K.; AKBARI NOGHABI, K.; SHAHBANI ZAHIRI, H. Development of a bifunctional xylanase-cellulase chimera with enhanced activity on rice and barley straws using a modular xylanase and an endoglucanase procured from camel rumen metagenome. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 18, p. 6929–6939, 2017.

KIM, M. J.; JANG, M. U.; NAM, G. H.; SHIN, H.; SONG, J. R.; KIM, T. J. Functional expression and characterization of acetyl xylan esterases CE family 7 from *Lactobacillus antri* and *Bacillus halodurans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 155–162, 2020.

KIM, J. Y.; LEE, H. W.; LEE, S. M.; JAE, J.; PARK, Y. K. Overview of the recent advances in lignocellulose liquefaction for producing biofuels, bio-based materials and chemicals. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 373–384, 2019.

KIM, I. J.; LEE, H. J.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8469–8480, 2014a.

KIM, H. M.; LEE, K. H.; KIM, K. H.; LEE, D. S.; NGUYEN, Q. A.; BAE, H. J. Efficient function and characterization of GH10 xylanase (Xyl10g) from *Gloeophyllum trabeum* in lignocellulose degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 38–45, 2014b.

KIM, M. & DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 803–807, 2011.

KISHORE, D.; KUNDU, S.; KAYASTHA, A. M. Thermal, Chemical and pH Induced Denaturation of a Multimeric β -Galactosidase Reveals Multiple Unfolding Pathways. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

KLEYWEGT, G. J. *et al.* The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, n. 3, p. 383–397, 1997.

KONDAVEETI, S.; PATEL, S. K. S; WOO, J.; WEE, J. H.; KIM, S.Y.; AL-RAOUSH, R. I.; KIM, I. W.; KALIA, V. C.; LEE, J. K. Characterization of Cellobiohydrolases from *Schizophyllum commune* KMJ820. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 160–166, 2020.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 226–235, 2018.

KUMAR, V. & SHUKLA, P. Extracellular xylanase production from *T. lanuginosus* VAPS24 at pilot scale and thermostability enhancement by immobilization. **Process Biochemistry**, v. 71, p. 53–60, 2018.

KUMAR, V.; MARÍN-NAVARRO, J.; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 1–10, 2016.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

KWON-CHUNG, K. J. & SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus*-What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1–4, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, E. H.; GIARDINA, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: Biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1–8, 2011.

LAKBUB, J. C.; SHIPMAN, J. T.; DESAIRE, H. Recent mass spectrometry-based techniques and considerations for disulfide bond characterization in proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 10, p. 2467–2484, 2018.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. **Springer Science & Business Media**, 2013.

LAMBERTZ, C.; GARVEY, M.; KLINGER, J.; HEESEL, D.; KLOSE, H.; FISCHER, R.; COMMANDEUR, U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: A review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2014.

LE COSTAOUËC, T.; PAKARINEN, A.; VÁRNAI, A.; PURANEN, T.; VIKARI, L. The role of carbohydrate binding module (CBM) at high substrate consistency: Comparison of

Trichoderma reesei and *Thermoascus aurantiacus* Cel7A (CBHI) and Cel5A (EGII). **Bioresource Technology**, v. 143, p. 196–203, 2013.

LEE, C. R.; CHI, W. J.; LIM, J. H.; DHAKSHNAMOORTHY, V.; HONG, S. K. Expression and characterization of the processive exo- β -1,4-cellobiohydrolase SCO6546 from *Streptomyces coelicolor* A(3). **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 310–321, 2018.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–20, 2014.

LEJEUNE, A.; VANHOVE, M.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; PAIN, R. H.; FRÉRE, J. M.; MATAGNE, A. Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 α -lactamase. **Chemistry and Biology**, v. 8, n. 8, p. 831–842, 2001.

LI, C.; CHEN, C.; WU, X.; TSANG, C. W.; MOU, J.; YAN, J.; LIU, Y.; LIN, C. S. K. Recent advancement in lignin biorefinery: With special focus on enzymatic degradation and valorization. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121898, 2019a.

LI, G.; CHEN, X.; ZHOU, X.; HUANG, R.; LI, L.; MIAO, Y.; LIU, D.; ZHANG, R. Improvement of GH10 family xylanase thermostability by introducing of an extra α -helix at the C-terminal. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 515, n. 3, p. 417–422, 2019b.

LI, X. & ZHENG, Y. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 4, p. 466–489, 2017.

LI, X. Q.; WU, Q.; HU, D.; WANG, R.; LIU, Y.; WU, M. C.; LI, J. F. Improving the temperature characteristics and catalytic efficiency of a mesophilic xylanase from *Aspergillus oryzae*, AoXyn11A, by iterative mutagenesis based on in silico design. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.

LI, Y.; SUN, Z.; GE, X.; ZHANG, J. Effects of lignin and surfactant on adsorption and hydrolysis of cellulases on cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 0–9, 2016.

LIEW, K. J.; NGOOI, C. Y.; SHAMSIR, M. S.; SANI, R. K.; CHONG, C. S.; GOH, K. M. Heterologous expression, purification and biochemical characterization of a new endo-1,4- β -xylanase from *Rhodothermaceae bacterium* RA. **Protein Expression and Purification**, v. 164, p. 105464, 2019.

LIMAM, F.; CHAABOUNI, S. E.; GHRIR, R.; MARZOUKI, N. Two cellobiohydrolases of *Penicillium occitanis* mutant Pol 6: Purification and properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 4, p. 340–346, 1995.

LIN, W.; CHEN, D.; YONG, Q.; HUANG, C.; HUANG, S. Improving enzymatic hydrolysis of acid-pretreated bamboo residues using amphiphilic surfactant derived from dehydroabietic acid. **Bioresource Technology**, v. 293, p. 122055, 2019.

LIU, Y. J.; LI, B.; FENG, Y.; CUI, Q. Consolidated bio-saccharification: Leading lignocellulose bioconversion into the real world. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107535, 2020.

LIU, Q.; LUO, L.; ZHENG, L. Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

LIU, Y.; DUN, B.; SHI, P.; MA, R.; LUO, H.; BAI, Y.; XIE, X.; YAO, B. A novel GH7 Endo- β -1,4-glucanase from *Neosartorya fischeri* P1 with good thermostability, broad substrate specificity and potential application in the brewing industry. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 2015.

LIU, D.; LI, J.; ZHAO, S.; ZHANG, R.; WANG, M.; MIAO, Y.; SHEN, Y.; SHEN, Q. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y.; SHEN, Q. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microbial Cell Factories**, v. 11, 2012.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 717–725, 2011a.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; XU, Y.; TANG, Z.; TIAN, W.; SHEN, Q. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. **Protein Expression and Purification**, v. 79, n. 2, p. 176–186, 2011b.

LIU, Y.; YOSHIDA, M.; KURAKATA, Y.; MIYAZAKI, T.; IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; FUKUDA, K.; NISHIKAWA, A.; TONOZUKA, T. Crystal structure of a glycoside hydrolase family 6 enzyme, CcCel6C, a cellulase constitutively produced by *Coprinopsis cinerea*. **FEBS Journal**, v. 277, n. 6, p. 1532–1542, 2010.

LOMBARD, V.; GOLACONDA, R. H.; DRULA, E.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D490–D495, 2014.

LOPES, A. M.; FERREIRA FILHO, E. X.; MOREIRA, L. R. S. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 632–645, 2018.

LOPES, V. S.; FISCHER, J.; PINHEIRO, T. M. A.; CABRAL, B. V.; CARDOSO, V. L.; COUTINHO FILHO, U. Biosurfactant and ethanol co-production using *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* co-cultures and exploded sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 109, p. 305–310, 2017.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; DE AMORIM NETO, H. B.; DE AMORIM, H.

V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

LÓPEZ, G. & ESTRADA, P. Effect of Temperature on Xylanase II from *Trichoderma reesei* QM 9414: A Calorimetric, Catalytic, and Conformational Study. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014.

LUO, H. *et al.* Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo- β -1,3-1,4- glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1015–1023, 2010.

LUO, H. *et al.* A thermophilic and acid stable family-10 xylanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 13, n. 5, p. 849–857, 2009.

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

MACHIDA, M. *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1157–1161, 2005.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, M. B.; NAGEM, R. A. P.; DE VRIES, R. P.; GUIMARÃES, V. M. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 60–67, 2016.

MALGAS, S. & PLETSCHKE, B. I. The effect of an oligosaccharide reducing-end xylanase, BhRex8A, on the synergistic degradation of xylan backbones by an optimised xylanolytic enzyme cocktail. **Enzyme and Microbial Technology**, 2019.

MALGAS, S.; THORESEN, M.; VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 103, p. 1–11, 2017.

MARTÍNEZ-ESPINOSA, R. M. Heterologous and homologous expression of proteins from haloarchaea: Denitrification as case of study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, 2020.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 37–53, 2009.

MAULANA HIDAYATULLAH, I.; SETIADI, T.; TRI ARI PENIA KRESNOWATI, M.; BOOPATHY, R. Xylanase inhibition by the derivatives of lignocellulosic material. **Bioresource Technology**, 2020.

McCARTER, J. D. & WITHERS, S. G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, p. 885–892, 1994.

MELDGAARD, M. & SVENDSEN, I. Different effects of N-glycosylation on the thermostability of highly homologous bacterial (1,3-1,4)- β -glucanases secreted from yeast. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 159–166, 1994.

MELEIRO, L. P.; CARLI, S.; FONSECA-MALDONADO, R.; TORRICILLAS, M. S.; ZIMBARDI, A. L. R. L.; WARD, R. J.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Overexpression of a Cellobiose-Glucose-Halotolerant Endoglucanase from *Scytalidium thermophilum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, p. 316–333, 2018.

MELLO, L. R. P. F. & MALI, S. Use of malt bagasse to produce biodegradable baked foams made from cassava starch. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 187–193, 2014.

MÉNDEZ-LÍTER, J. A.; DE EUGENIO, L. I.; NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Hemicellulases from *Penicillium* and *Talaromyces* for lignocellulosic biomass valorization: A review. **Bioresource Technology**, v. 324, 2021.

MÉNDEZ ARIAS, J.; 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. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 5, p. 1222–1229, 2016.

MHIRI, S.; BOUANANE-DARENFED, A.; JEMLI, S.; NEIFAR, S.; AMERI, R.; MEZGHANI, M.; BOUACEM, K.; JAOUADI, B.; BEJAR, S. A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 808–817, 2020.

MHLONGO, N. N.; SKELTON, A. A.; KRUGER, G.; SOLIMAN, M. E. S.; WILLIAMS, I. H. A critical survey of average distances between catalytic carboxyl groups in glycoside hydrolases. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 82, n. 9, p. 1747–1755, 2014.

MIAO, Y.; KONG, Y.; LI, P.; LI, G.; LIU, D.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Effect of CBM1 and linker region on enzymatic properties of a novel thermostable dimeric GH10 xylanase (Xyn10A) from filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* Z5. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

MIAO, Y.; LIU, D.; LI, G.; LI, P.; XU, Y.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Genome-wide transcriptomic analysis of a superior biomass-degrading strain of *A. fumigatus* revealed active lignocellulose-degrading genes. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–20, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIOTTO, M.; OLIMPIERI, P. P.; DI RIENZO, L.; AMBROSETTI, F.; CORSI, P.; LEPORE, R.; TARTAGLIA, G. G.; MILANETTI, E. Insights on protein thermal stability: A graph representation of molecular interactions. **Bioinformatics**, v. 35, n. 15, p. 2569–2577, 2019.

MOHD AZHAR, S. H.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; MOHD FAIK, A. A.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, 2017.

MONCLARO, A. V.; RECALDE, G. L.; DA SILVA, F. G.; DE FREITAS, S. M.; FERREIRA FILHO, E. X. Xylanase from *Aspergillus tamarii* shows different kinetic parameters and substrate specificity in the presence of ferulic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 120, n. June 2018, p. 16–22, 2019.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

MOROZ, O. V.; MARANTA, M.; SHAGHASI, T.; HARRIS, P. V.; WILSON, K. S.; DAVIES, G. J. The three-dimensional structure of the cellobiohydrolase Cel7A from *Aspergillus fumigatus* at 1.5 Å resolution. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 71, p. 114–120, 2015.

MOYSÉS, D. N.; REIS, V. C. B.; DE ALMEIDA, J. R. M.; DE MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–18, 2016.

MUKHOPADHYAY, A. Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 56, p. 61–109, 1997.

NAIKA, G. S.; KAUL, P.; PRAKASH, V. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7566–7572, 2007.

NAKABAYASHI, M.; KAMACHI, S.; MALLE, D.; YANAMOTO, T.; KISHISHITA, S.; FUJII, T.; INOUE, H.; ISHIKAWA, K. Construction of thermostable cellobiohydrolase i from the fungus *Talaromyces cellulolyticus* by protein engineering. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 32, n. 1, p. 33–40, 2019.

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 and Biodegradation**, v. 88, p. 150–161, 2014.

NATESH, R.; BHANUMOORTHY, P.; VITHAYATHIL, P. J.; SEKAR, K.; RAMAKUMAR, S.; VISWAMITRA, M. A. Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 288, n. 5, p. 999–1012, 1999.

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184–194, 2016.

NIERMAN, W. C. *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1151–1156, 2005.

NORATIQA, K.; MADIHAH, M. S.; AISYAH, B. S.; EVA, M. S.; SURAINI, A. A.; KAMARULZAMAN, K. Statistical optimization of enzymatic degradation process for oil palm empty fruit bunch (OPEFB) in rotary drum bioreactor using crude cellulase produced from *Aspergillus niger* EFB1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 8–20, 2013.

NOVACANA. CEO da BP vê forte demanda global por petróleo “por um tempo”. NovaCana, 2021. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/gasolina/ceo-bp-forte-demanda-global-petroleo-tempo-090621>. Acesso em: 25 ago. 2021.

NOVACANA. Levantamento inédito detalha produção de etanol celulósico de Raízen e GranBio. NovaCana, 2020. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/levantamento-inedito-detalhes-producao-etanol-celulosico-raizen-granbio-270820>. Acesso em: 25 ago. 2021.

NOVACANA. A situação do etanol celulósico é crítica, mas todos concordam que ela também é temporária. Mas conseguirá o etanol celulósico atingir um ponto sem volta antes que os investidores percam a disposição financeira para suportar o desenvolvimento da tecnologia?. NovaCana, 2016. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/custo-producao-etanol-celulosico-usinas-mundo-150316>. Acesso em: 25 ago. 2021.

OBENG, E. M.; BUDIMAN, C.; ONGKUDON, C. M. Identifying additives for cellulase enhancement—A systematic approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. June, p. 67–74, 2017.

OBYDENKOVA, S. V.; KOURIS, P. D.; HENSEN, E. J. M.; SMEULDERS, D. M. J.; VAN DER MEER, Y.; BOOT, M. D. Industrial lignin from 2G biorefineries – Assessment of availability and pricing strategies. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121805, 2019.

OGUNYEW, O. A.; RANDHAWA, A.; GUPTA, M.; KALADHAR, V. C.; VERMA, P. K.; YAZDANI, S. S. Synergistic Action of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase and a Cellobiohydrolase from *Penicillium funiculosum* in Cellulose Saccharification under High-Level Substrate Loading. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 23, p. 1–21, 2020.

OKADA, H.; SEKIYA, T.; YOKOYAMA, K.; TOHDA, H.; KUMAGAI, H.; MORIKAWA, Y. Efficient secretion of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of its products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 301–308, 1998.

OLIVEIRA, D. S.; MEHERB-DINI, C.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production of crude xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 588–594, 2010.

ØSTBY, H.; HANSEN, L. D.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H.; VÁRNAI, A. Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 47, p. 623–657, 2020.

PANDIYAN, K.; TIWARI, R.; SINGH, S.; NAIN, P. K. S.; RANA, S.; ARORA, A.; SINGH, S. B.; NAIN, L. Optimization of enzymatic saccharification of alkali pretreated *Parthenium* sp. Using response surface methodology. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014.

PASIN, T. M. *et al.* A Halotolerant Endo-1,4- β -Xylanase from *Aspergillus clavatus* with Potential Application for Agroindustrial Residues Saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, n. 3, p. 1111–1126, 2020.

PAULOVA, L.; PATAKOVA, P.; BRANSKA, B.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1091–1107, 2015.

PEI, J.; PANG, Q.; ZHAO, L.; FAN, S.; SHI, H. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: A glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–10, 2012.

PEL, H. J. *et al.* Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221–231, 2007.

PELLEGRINI, V. O. A. *et al.* Recombinant *Trichoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 22, p. 9591–9604, 2015.

PEREIRA, J. C.; GIESE, E. C.; MORETTI, M. M. S.; GOMES, A. C. S.; PERRONE, O. M.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities. In: **Enzyme Inhibitors and Activators**, p. 139-164, 2017.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 50, p. 1–39, 2007.

PUCCI, F.; BOURGEAS, R.; ROOMAN, M. Predicting protein thermal stability changes upon point mutations using statistical potentials: Introducing HoTMuSiC. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.

QUAN, J. & TIAN, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, 2011.

RANI SINGHANIA, R.; DIXIT, P.; KUMAR PATEL, A.; SHEKHER GIRI, B.; KUO, C. H.; CHEN, C. Wen.; DI DONG, C. Role and significance of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) in lignocellulose deconstruction. **Bioresource Technology**, v. 335, p. 125261, 2021.

REDDY DODDA, S.; SARKAR, N.; AIKAT, K.; R. KRISHNARAJ, N.; BHATTACHARJEE, S.; BAGCHI, A.; S. MUKHOPADHYAY, S. Insights from the Molecular Dynamics Simulation of Cellobiohydrolase Cel6A Molecular Structural Model from *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 19, n. 4, p. 325–333, 2016.

RIBEIRO, L. F. C. *et al.* A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

ROCHA-MARTÍN, J.; MARTINEZ-BERNAL, C.; PÉREZ-COBAS, Y.; REYES-SOSA, F. M.; GARCÍA, B. D. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 2017.

ROCHA, V. A. L.; MAEDA, R. N.; PEREIRA, N.; KERN, M. F.; ELIAS, L.; SIMISTER, R. STEELE-KING, C.; GÓMEZ, L. D.; MCQUEEN-MASON, S. J. Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 2, p. 327–336, 2016.

ROKAS, A.; GIBBONS, J. G.; ZHOU, X.; BEAUVAIS, A.; LATGÉ, J. P. The diverse applications of RNA-seq for functional genomic studies in *Aspergillus fumigatus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1273, n. 1, p. 25–34, 2012.

ROSA, L.; RAVANAL, M. C.; MARDONES, W.; EYZAGUIRRE, J. Characterization of a recombinant α -glucuronidase from *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Biology**, v. 117, n. 5, p. 380–387, 2013.

ROSALES-CALDERON, O. & ARANTES, V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, 2019.

ROSANO, G. L. & CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–17, 2014.

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**, 2016.

RUNGRATTANAKASIN, B.; PREMJET, S.; THANONKEO, S.; KLANRIT, P.; THANONKEO, P. Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DBiNU-1 in *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 647–655, 2018.

SAMBUSITI, C.; BELLUCCI, M.; ZABANIOTOU, A.; BENEDUCE, L.; MONLAU, F. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 20–36, 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS, F.; EICHLER, P.; DE QUEIROZ, J. H.; GOMES, F. Production of second-generation ethanol from sugarcane. In: **Biorefinery, Technology and Perspectives**, p. 195–228, 2020.

SAROJ, P.; MANASA, P.; NARASIMHULU, K. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, 2018.

SAVITZKY, A. & GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

SAYED JAMALUDIN, S. I.; SYED ABD KADIR, S. A.; KRISHNAN, J.; SAFRI, N. H. M. Optimization of enzymatic hydrolysis of kitchen waste using response surface methodology (RSM) for reducing sugar production. **IEEE Business Engineering and Industrial Applications Colloquium (BEIAC)**, p. 322–326, 2013.

SEGATO, F. *et al.* Cloning, heterologous expression and biochemical characterization of a non-specific endoglucanase family 12 from *Aspergillus terreus* NIH2624. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, n. 4, p. 395–403, 2017.

SEGATO, F.; DAMÁSIO, A. R. L.; DE LUCAS, R. C.; SQUINA, F. M.; PRADE, R. A. Genomics Review of Holocellulose Deconstruction by Aspergilli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588–613, 2014.

SHAH, V.; PIERRE, B.; KIRTADZE, T.; SHIN, S.; KIM, J. R. Stabilization of *Bacillus circulans* xylanase by combinatorial insertional fusion to a thermophilic host protein. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 30, n. 4, p. 281–290, 2017.

SHARMA, B.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C. G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 313, p. 123630, 2020.

SHI, H.; ZHANG, Y.; LI, X.; HUANG, Y.; WANG, L.; WANG, Y.; DING, H.; WANG, F. A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca^{2+} from *Thermotoga thermarum*: Cloning, expression and characterization. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2013.

SHIBATA, N.; SUETSUGU, M.; KAKESHITA, H.; IGARASHI, K.; HAGIHARA, H.; TAKIMURA, Y. A novel GH10 xylanase from *Penicillium* sp. accelerates saccharification of alkaline-pretreated bagasse by an enzyme from recombinant *Trichoderma reesei* expressing *Aspergillus* β -glucosidase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

SHIKINAKA, K.; OTSUKA, Y.; NAKAMURA, M.; MASAI, E.; KATAYAMA, Y. Utilization of lignocellulosic biomass via novel sustainable process. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 9, p. 1059–1070, 2018.

SHIN, H. D.; VO, T.; CHEN, R. Novel *Aspergillus* hemicellulases enhance performance of commercial cellulases in lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 581–586, 2011.

SIDAR, A.; ALBUQUERQUE, E. D.; VOSHOL, G. P.; RAM, A. F. J.; VIJGENBOOM, E.; PUNT, P. J. Carbohydrate Binding Modules: Diversity of Domain Architecture in Amylases

and Cellulases From Filamentous Microorganisms. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1–15, 2020.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76–82, 2016.

SINDREWICZ, P.; LI, X.; YATES, E. A.; TURNBULL, J. E.; LIAN, L. Y.; YU, L. G. Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

SINGH, A.; PATEL, A. K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R. R. Genetic modification: A tool for enhancing cellulase secretion. **Biofuel Research Journal**, v. 4, n. 2, p. 600–610, 2017.

SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399–402, 2013.

SONG, H. T.; GAO, Y.; YANG, Y. M.; XIAO, W. J.; LIU, S. H.; XIA, W. C.; LIU, Z. L.; YI, L.; JIANG, Z. B. Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 710–715, 2016.

SONG, J.; LIU, B.; LIU, Z.; YANG, Q. Cloning of two cellobiohydrolase genes from *Trichoderma viride* and heterogenous expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 2135–2140, 2010.

SONODA, M. T.; GODOY, A. S.; PELLEGRINI, V. O. A.; KADOWAKI, M. A. S.; NASCIMENTO, A. S.; POLIKARPOV, I. Structure and dynamics of *Trichoderma harzianum* Cel7B suggest molecular architecture adaptations required for a wide spectrum of activities on plant cell wall polysaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1863, n. 6, p. 1015–1026, 2019.

SOUZA, G. M.; VICTORIA, R. L.; JOLY, C. A.; VERDADE, L. M. Bioenergy and sustainability: Bridging the gaps. Paris: **SCOPE**, 2015.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; SINGH, P.; RAMTEKE, P. W. Application of Cellulases in Biofuels Industries: An Overview. **Journal of Biofuels and Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 55, 2015.

STRAKOWSKA, J.; BŁASZCZYK, L.; CHEŁKOWSKI, J. The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. SUPPL.1, p. 2–13, 2014.

SU, T.; ZHAO, D.; KHODADADI, M.; LEN, C. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 24, p. 56–60, 2020.

SUN, F. F.; BAI, R.; YANG, H.; WANG, F.; HE, J.; WANG, C.; TU, M. Enzyme and Microbial Technology Heterologous expression of codon optimized *Trichoderma reesei* Cel6A in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 92, p. 107–116, 2016.

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.

TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, H.; NAKANO, Y.; KONISHI, T.; TERAUCHI, R.; TAKEDA, T. Characterization of a Cellobiohydrolase (MoCel6A) Produced by *Magnaporthe oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6583–6590, 2010.

TAKITA, T. *et al.* Increase in the thermostability of GH11 xylanase XynJ from *Bacillus* sp. strain 41M-1 using site saturation mutagenesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, p. 109363, 2019.

TANEJA, K.; GUPTA, S.; CHANDER KUHAD, R. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 1, p. 39–42, 2002.

CARPIO, L. G. T. & SOUZA, F. S. Competition between Second-Generation Ethanol and Bioelectricity using the Residual Biomass of Sugarcane: Effects of Uncertainty on the Production Mix. **Molecules**, v. 24, n. 2, 2019.

TEUGJAS, H. & VÄLJAMÄE, P. Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. **Biotechnology for Biofuels**, 2013.

TIAN, D.; CHANDRA, R. P.; LEE, J. S.; LU, C.; SADDLER, J. N. A comparison of various lignin-extraction methods to enhance the accessibility and ease of enzymatic hydrolysis of the cellulosic component of steam-pretreated poplar. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

TODA, H.; NAGAHATA, N.; AMANO, Y.; NOZAKI, K.; KANDA, T.; OKAZAKI, M.; SHIMOSAKA, M. Gene Cloning of Cellobiohydrolase II from the White Rot Fungus *Irpex lacteus* MC-2 and Its Expression in *Pichia pastoris*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 12, p. 3142–3147, 2008.

TOKIN, R.; IPSEN, J. Ø.; WESTH, P.; JOHANSEN, K. S. The synergy between LPMOs and cellulases in enzymatic saccharification of cellulose is both enzyme- and substrate-dependent. **Biotechnology Letters**, 2020.

TOOR, M.; KUMAR, S. S.; MALYAN, S. K.; BISHNOI, N. R.; MATHIMANI, T.; RAJENDRAN, K.; PUGAZHENDHI, A. An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Chemosphere**, v. 242, p. 125080, 2020.

TUOHY, M. G.; WALSH, D. J.; MURRAY, P. G.; CLAEYSENS, M.; CU, M. M.; SAVAGE, A. V.; COUGHLAN, M. P. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1596, p. 366–380, 2002.

TURNER, T. L.; ZHANG, G. C.; KIM, S. R.; SUBRAMANIAM, V.; STEFFEN, D.; SKORY, C. D.; JANG, J. Y.; YU, B. J.; JIN, Y. S. Lactic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without PDC or ADH deletion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 8023–8033, 2015.

UDAY, U. S. P.; MAJUMDAR, R.; TIWARI, O. N.; MISHRA, U.; MONDAL, A.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Isolation, screening and characterization of a novel extracellular xylanase from *Aspergillus niger* (KP874102.1) and its application in orange peel hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 401–409, 2017.

ULLAH, S. F.; SOUZA, A. A.; HAMANN, P. R. V.; TICONA, A. R. P.; OLIVEIRA, G. M.; BARBOSA, J. A. R. G.; FREITAS, S. M.; NORONHA, E. F. Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 385–395, 2019.

UNICADATA, fonte: www.observatoriodacana.com.br. Acesso em: 25 ago. 2021.

USTINOV, B. B.; GUSAKOV, A. V.; ANTONOV, A. I.; SINITSYN, A. P. Comparison of properties and mode of action of six secreted xylanases from *Chrysosporium lucknowense*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 1, p. 56–65, 2008.

VALENZUELA, S. V.; VALLS, C.; SCHINK, V.; SÁNCHEZ, D.; RONCERO, M. B.; DIAZ, P.; MARTÍNEZ, J.; PASTOR, F. I. J. Differential activity of lytic polysaccharide monooxygenases on celluloses of different crystallinity. Effectiveness in the sustainable production of cellulose nanofibrils. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 59–67, 2019.

van den BRINK, J. & de VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 2011.

VAN DYK, J. S. & PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

van EERDE, A. *et al.* In-depth characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase TrCel7A produced in *Nicotiana benthamiana* reveals limitations of cellulase production in plants by host-specific post-translational modifications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 3, p. 631–643, 2020.

van GOOL, M. P.; van MUISWINKEL, G. C. J.; HINZ, S. W. A.; SCHOLS, H. A.; SINITSYN, A. P.; GRUPPEN, H. Two novel GH11 endo-xylanases from *Myceliophthora thermophila* C1 act differently toward soluble and insoluble xylans. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 1, p. 25–32, 2013.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: Reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.

VARROT, A.; HASTRUP, S.; SCHÜLEIN, M.; DAVIES, G. J. Crystal structure of the catalytic core domain of the family 6 cellobiohydrolase II, Cel6A, from *Humicola insolens*, at 1.92 Å resolution. **Biochemical Journal**, v. 337, n. 2, p. 297–304, 1999.

VAZQUEZ-ORTEGA, P. G.; ALCARAZ-FRUCTUOSO, M. T.; ROJAS-CONTRERAS, J. A.; LÓPEZ-MIRANDA, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of dimeric β -

glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 110, p. 38–45, 2018.

VELASCO, J.; PELLEGRINI, V. O. A.; SEPULCHRO, A. G. V.; KADOWAKI, M. A. S.; SANTO, M. C. E.; POLIKARPOV, I.; SEGATO, F. Comparative analysis of two recombinant LPMOs from *Aspergillus fumigatus* and their effects on sugarcane bagasse saccharification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 144, p. 109746, 2021.

VENKATA MOHAN, S.; DAHIYA, S.; AMULYA, K.; KATAKOJWALA, R.; VANITHA, T. K. Can circular bioeconomy be fueled by waste biorefineries — A closer look. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100277, 2019.

VERMAAS, J. V.; KONT, R.; BECKHAM, G. T.; CROWLEY, M. F.; GUDMUNDSSON, M.; SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; VÄLJAMÄE, P.; KNOTT, B. C. The dissociation mechanism of processive cellulases. **PNAS**, v. 116, n. 46, p. 23061–23067, 2019.

VIEILLE, C. & ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 1–43, 2001.

VIEIRA, S.; BARROS, M. V.; SYDNEY, A. C. N.; PIEKARSKI, C. M.; DE FRANCISCO, A. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SYDNEY, E. B. Sustainability of sugarcane lignocellulosic biomass pretreatment for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122635, 2020.

VU, H. P.; NGUYEN, L. N.; VU, M. T.; JOHIR, M. A. H.; MCLAUGHLAN, R.; NGHIEM, L. D. A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biorefinery feedstocks. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140630, 2020.

VUONG, T. V. & WILSON, D. B. The absence of an identifiable single catalytic base residue in *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. **FEBS Journal**, v. 276, n. 14, p. 3837–3845, 2009.

WAHAB, A. F. F. A.; ABDUL KARIM, N. A.; LING, J. G.; HASAN, N. S.; YONG, H. Y.; BHARUDIN, I.; KAMARUDDIN, S.; ABU BAKAR, F. D.; MURAD, A. M. A. Functional characterisation of cellobiohydrolase I (Cbh1) from *Trichoderma virens* UKM1 expressed in *Aspergillus niger*. **Protein Expression and Purification**, v. 154, p. 52–61, 2019.

WALLACE, B. A. & JANES, R. W. Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. Amsterdam: **IOS press**, 2009.

WANG, Y.; LENG, L.; ISLAM, M. K.; LIU, F.; LIN, C. S. K.; LEU, S. Y. Substrate-related factors affecting cellulosome-induced hydrolysis for lignocellulose valorization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, 2019a.

WANG, M. *et al.* The diversity of glycosylation of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* determined with mass spectrometry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 508, n. 3, p. 818–824, 2019b.

WANG, K.; CAO, R.; WANG, M.; LIN, Q.; ZHAN, R.; XU, H.; WANG, S. A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a

xylanolytic *Bacillus* strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1.5 L in pretreated corn stover hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2019c.

WANG, H. *et al.* Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a novel GH11 xylanase from saline-alkali soil with excellent tolerance to high pH, high salt concentrations and ethanol. **Protein Expression and Purification**, v. 139, n. 29, p. 71–77, 2017.

WANG, X. *et al.* Improvement of the catalytic performance of a hyperthermostable GH10 xylanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 277–284, 2016.

WANG, K.; LUO, H.; SHI, P.; HUANG, H.; BAI, Y.; YAO, B. A highly-active endo-1,3-1,4- β -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394.64 with application potential in the brewing and feed industries. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1448–1456, 2014.

WANG, H. C.; CHEN, Y. C.; HUANG, C. T.; HSEU, R. S. Cloning and characterization of a thermostable and pH-stable cellobiohydrolase from *Neocallimastix patriciarum* J11. **Protein Expression and Purification**, v. 90, n. 2, p. 153–159, 2013.

WANG, X. J.; PENG, Y. J.; ZHANG, L. Q. Directed evolution and structural prediction of cellobiohydrolase II from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 95, p. 1469–1478, 2012.

WU, Q.; FAN, G.; YU, T.; SUN, B.; TANG, H.; TENG, C.; YANG, R.; LI, X. Biochemical characteristics of the mutant xylanase T-XynC(122)C(166) and production of xylooligosaccharides from corncobs. **Industrial Crops and Products**, v. 142, p. 111848, 2019.

XIONG, H.; NYSSÖLÄ, A.; JÄNIS, J.; PASTINEN, O.; VON WEYMARN, N.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 93–99, 2004.

XU, N.; LIU, S.; XIN, F.; ZHOU, J.; JIA, H.; XU, J.; JIANG, M.; DONG, W. Biomethane production from lignocellulose: Biomass recalcitrance and its impacts on anaerobic digestion. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1–12, 2019.

YAN, J. *et al.* Functional and structural analysis of *Pichia pastoris*-expressed *Aspergillus Niger* 1,4- β -endoglucanase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 475, n. 1, p. 8–12, 2016.

YANG, J.; MA, T.; SHANG-GUAN, F.; HAN, Z. Improving the catalytic activity of thermostable xylanase from *Thermotoga maritima* via mutagenesis of non-catalytic residues at glycone subsites. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 139, p. 109579, 2020.

YANG, J.; DENG, L.; ZHAO, C.; FANG, H. Heterologous expression of *Neurospora crassa* cbh1 gene in *Pichia pastoris* resulted in production of a neutral cellobiohydrolase I. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 3, 2019.

YOO, C. G.; MENG, X.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122784, 2020.

ZHANG, J.; ZHANG, X.; YANG, M.; SINGH, S.; CHENG, G. Transforming lignocellulosic biomass into biofuels enabled by ionic liquid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 322, p. 124522, 2021.

ZHANG, W.; LIU, C.; QU, M.; PAN, K.; OUYANG, K.; SONG, X.; ZHAO, X. Construction and characterization of a chimeric enzyme of swollenin and xylanase to improve soybean straw hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.156, p.558–564, 2020.

ZHANG, H.; LI, J.; WANG, J.; YANG, Y.; WU, M. Determinants for the improved thermostability of a mesophilic family 11 xylanase predicted by computational methods. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

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

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. 14, n. 1, 2013.

ZHAO, J.; SHI, P.; YUAN, T.; HUANG, H.; LI, Z.; MENG, K.; YANG, P.; YAO, B. Purification, gene cloning and characterization of an acidic β -1,4-glucanase from *Phialophora* sp. G5 with potential applications in the brewing and feed industries. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 379–384, 2012.

ZHOU, H. Y. *et al.* Heterologous expression and biochemical characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from *Colletotrichum orchidophilum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 1, p. 67–79, 2021.

ZHOU, Y.; CHEN, H.; QI, F.; ZHAO, X.; LIU, D. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 136–143, 2015.

ZHOU, J.; GAO, Y.; DONG, Y.; TANG, X.; LI, J.; XU, B.; MU, Y.; WU, Q.; HUANG, Z. A novel xylanase with tolerance to ethanol, salt, protease, SDS, heat, and alkali from actinomycete *Lechevalieria* sp. HJ3. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 965–975, 2012.

ZHOU, J.; SHI, P.; ZHANG, R.; HUANG, H.; MENG, K.; YANG, P.; YAO, B. Symbiotic *Streptomyces* sp. TN119 GH 11 xylanase: A new pH-stable, protease- and SDS-resistant xylanase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 523–530, 2011.

ZOU, G.; BAO, D.; WANG, Y.; ZHOU, S.; XIAO, M.; YANG, Z.; WANG, Y.; ZHOU, Z. Alleviating product inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase complex with a product-activated mushroom endoglucanase. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124119, 2021.

Apêndices

APÊNDICE A – Meios de cultura

Meio YAG

Ágar	2% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Após resfriar (~ 60 °C), adicionou-se glicose (solução previamente esterilizada) para uma concentração final de 2% (p/v).

Meio YNB

Extrato de levedura	0,05% (p/v)
Solução de sais 20X	5% (v/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻².

Meio Luria-Bertani (LB)

Triptona	1% (p/v)
NaCl	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Para o meio sólido LB, foi acrescentado 1,5% (p/v) de ágar.

Meio SOB

Triptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,05% (p/v)
KCl	2,5 mM

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o pH foi ajustado para 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Imediatamente antes do uso, adicionou-se MgCl₂ (solução previamente esterilizada) para uma concentração final de 10 mM.

Meio SOC

Meio SOB estéril	48,75 mL
MgCl ₂ 2 M estéril	250 µL
Glicose 1 M estéril	1 mL
Volume final	50 mL

Meio Terrific-Broth (TB)

Extrato de levedura	24 g
Triptona	12 g
Glicerol	4 mL
H ₂ O milli-Q	q.s.p.
Volume final	900 mL

Após a dissolução dos componentes acima, o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Após resfriar, adicionou-se 100 mL de solução estéril KH₂PO₄ 0,17 M / K₂HPO₄ 0,72 M.

Meio LB *low salt*

Triptona	1% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Para o meio sólido LB *low salt*, foi acrescentado 1,5% (p/v) de ágar.

Meio YPD

Peptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Após resfriar (~ 60 °C), adicionou-se glicose (solução previamente esterilizada) para uma concentração final de 2% (p/v). Para o meio sólido YPD, foi acrescentado 2% (p/v) de ágar.

Meio YPDS

Peptona	2% (p/v)
Ágar	2% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)
Sorbitol	1 M

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Após resfriar (~ 60 °C), adicionou-se glicose (solução previamente esterilizada) para uma concentração final de 2% (p/v).

Meio BMGY

Peptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Após resfriar (temperatura ambiente), adicionou-se tampão fosfato de potássio (pH 6,0), base de nitrogênio para levedura (com sulfato de amônio e sem aminoácidos), biotina e glicerol para as concentrações finais de 100 mM, 1,34% (p/v), 4 10⁻⁵ % (p/v) e 1% (v/v), respectivamente. Todas essas soluções haviam sido previamente esterilizadas. O meio foi armazenado a 4 °C.

Meio BMMY

Peptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	1% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf cm⁻². Após resfriar (temperatura ambiente), adicionou-se tampão fosfato de potássio (pH 6,0), base de nitrogênio para levedura (com sulfato de amônio e sem aminoácidos) e biotina para as concentrações finais de 100 mM, 1,34% (p/v) e 4 10⁻⁵ % (p/v), respectivamente. Metanol foi adicionado para a concentração final de 1% (v/v) ou 1,5% (v/v). Todas essas soluções haviam sido previamente esterilizadas. O meio foi armazenado a 4 °C.

APÊNDICE B – Soluções e tampões

Solução de elementos traços

ZnSO ₄ .7H ₂ O	75 mM
H ₃ BO ₃	180 mM
MnCl ₂ .4H ₂ O	25 mM
FeSO ₄ .7H ₂ O	18 mM
CoCl ₂ .5H ₂ O	6 mM
CuSO ₄ .5H ₂ O	6 mM
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1 mM
EDTA	140 mM

As substâncias que compõem a solução foram adicionadas e dissolvidas em H₂O milli-Q, uma a uma, seguindo a ordem listada. A solução foi aquecida até 100 °C e, após resfriamento, ajustou-se o pH com NaOH para 6,5-6,8.

Solução de sais 20X concentrada

NaNO ₃	3,2 M
KCl	140 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	40 mM
KH ₂ PO ₄	200 mM

As substâncias que compõem a solução foram dissolvidas em H₂O milli-Q.

Solução TB

Solução PIPES pH 7,0	10 mM
MnCl ₂ .4H ₂ O	55 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	15 mM
KCl	250 mM

As substâncias listadas foram dissolvidas em H₂O milli-Q. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada a 4 °C.

Tampão de amostra 5X para eletroforese de RNA

Formamida	52,8% (v/v)
Tampão MOPS 10X pH 7,0	10,5% (v/v)
Formaldeído	16,9% (v/v)
Glicerol	7% (v/v)
Azul de bromofenol	5,6% (p/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O livre de RNase.

Tampão de corrida para eletroforese de RNA

Tampão MOPS pH 7,0	1X
Formaldeído	2% (v/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q.

Tampão MOPS 10X pH 7,0

MOPS	200 mM
NaOAc.3H ₂ O	50 mM
EDTA	10 mM

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o pH foi ajustado para 7,0. Em seguida, completou-se o volume.

Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X para eletroforese de DNA

Tris	2 M
Ácido acético glacial	1 M
EDTA (pH 8,0)	50 mM

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q. Para utilização como tampão de eletroforese, o mesmo foi diluído 50X em H₂O milli-Q. A composição do tampão 1X é, portanto, a seguinte: Tris 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM (pH 8,0).

Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE

β -mercaptoetanol	2% (v/v)
Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
Glicerol	10% (v/v)
SDS	2% (p/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q.

Tampão de corrida Tris-Glicina 5X para SDS-PAGE

Tris	125 mM
Glicina	1,25 M
SDS	0,5% (p/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q. Para utilização como tampão de eletroforese, o mesmo foi diluído 5X em H₂O milli-Q. A composição do tampão 1X é, portanto, a seguinte: Tris 25 mM, glicina 250 mM e SDS 0,1% (p/v), pH 8,3.

Solução corante de *Coomassie Brilliant Blue G-250*

<i>Coomassie</i> coloidal (G-250, Sigma-Aldrich)	0,25% (p/v)
Metanol	45% (v/v)
Ácido acético glacial	10% (v/v)

A solução foi preparada dissolvendo-se o *coomassie* em uma solução 1:1 de metanol e H₂O milli-Q. Em seguida, adicionou-se o ácido acético glacial. Por fim, a solução foi filtrada (filtração simples em papel de filtro) e armazenada a temperatura ambiente, protegida da luz.

Tampão de amostra 5X (não-redutor) para zimograma

Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
Glicerol	20% (v/v)
SDS	4% (p/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q.

Tampão de ressuspensão celular 1X

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	50 mM
TCEP	1 mM
EDTA	0,5 mM
Glicerol	5% (v/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o pH foi ajustado para 8,0 com HCl.

Tampão de lavagem 1X

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	50 mM
TCEP	1 mM
EDTA	0,5 mM
Glicerol	5% (v/v)
Triton X-100	1% (v/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o pH foi ajustado para 8,0 com HCl.

Tampão de desnaturação 1X

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	50 mM
TCEP	5 mM
EDTA	0,5 mM
Glicerol	5% (v/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o pH foi ajustado para 8,0 com HCl.

Tampão de diálise 1X

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
TCEP	0,1 mM
EDTA	0,05 mM
SLS 30%	0,06% (v/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o pH foi ajustado para 8,0 com HCl.

Tampão de *refolding* C9

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Ciclodextrina	12,5 mM
EDTA	1 mM

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em H₂O milli-Q e o pH foi ajustado para 7,5 com HCl.

APÊNDICE C – Resultados dos sequenciamentos (sequências traduzidas)

(*) Aminoácidos idênticos

(:) Aminoácidos altamente similares

Sequenciamento do gene *Af-egl7* clonado em pGEM®-T Easy

Sequenciamento MDSKRGVVA AVLALLPLVSAQQPAASSAGNPKLTTYKCTTAGGCVAQDTSVVLDWGYHWI
Banco de dados MDSKRGVVA AVLALLPLVSAQQPAASSAGNPKLTTYKCTTAGGCVAQDTSVVLDWGYHWI

Sequenciamento HTVDGYTSCTTSSGVDSTLCPDAATCAKNCVIEPANHTSAGVTTSGDSLTMYYVQVQSNQV
Banco de dados HTVDGYTSCTTSSGVDSTLCPDAATCAKNCVIEPANHTSAGVTTSGDSLTMYYVQVQSNQV
*****:

Sequenciamento YTNASPRLYLLGPDKNYVMLKLLGQELTFDVLSTLPCGENGALYLSEMSATGGRNEYNT
Banco de dados YTNASPRLYLLGPDKNYVMLKLLGQELTFDVLSTLPCGENGALYLSEMSATGGRNEYNT

Sequenciamento GGAEYGSYGCDACQCPVIAWKNGLTNTSGASYCCNEMDILEANSRANSYTPHPCSATDCDK
Banco de dados GGAEYGSYGCDACQCPVIAWKNGLTNTSGASYCCNEMDILEANSRANSYTPHPCSATDCDK

Sequenciamento GGCGFNPYALGQKSYWGPGGTVDTSKPFTITTTQFITDDGTTTGTLEIRRQYMQNGKVIA
Banco de dados GGCGFNPYALGQKSYWGPGGTVDTSKPFTITTTQFITDDGTTTGTLEIRRQYMQNGKVIA
*****:

Sequenciamento NAVSSTGVNSITEDWCTSVDSGAATFGGLTTMGKALGRGMVLIFSIWNDASGFMNWLD SG
Banco de dados NAVSSTGVNSITEDWCTSVDSGAATFGGLTTMGKALGRGMVLIFSIWNDASGFMNWLD SG

Sequenciamento NAGPCSSTEGNPDLIKAQNPTTHVFSNIRWGDIGSTFKGSDGSVTTTTSTTSTKTTTST
Banco de dados NAGPCSSTEGNPDLIKAQNPTTHVFSNIRWGDIGSTFKGSDGSVTTTTSTTSTKTTTST

Sequenciamento APGPTQTHYGQCGGQGTGPTACASPYTCQVLNPWYSQCL
Banco de dados APGPTQTHYGQCGGQGTGPTACASPYTCQVLNPWYSQCL

Sequenciamento do gene *Af-egl7* clonado em pPICZaA

```

Sequenciamento -----QQPAASSAGNPKLTTYKCTTAGGCVAQDTSVVLDWGYHWI
Banco de dados  MDSKRGVVA AVLALLPLVSAQQPAASSAGNPKLTTYKCTTAGGCVAQDTSVVLDWGYHWI
                  *****

Sequenciamento HTVDGYTSCTTSSGVDSTLCPDAATCAKNCVIEPANHTSAGVTTSGDSLTM YQYVQSNV
Banco de dados  HTVDGYTSCTTSSGVDSTLCPDAATCAKNCVIEPANHTSAGVTTSGDSLTM YQYVQSNV
                  *****:*****

Sequenciamento YTNASPRLYLLGPDKNYVMLKLLGQELTFD VDLSTLPCGENGALYLSEMSATGGRNEYNT
Banco de dados  YTNASPRLYLLGPDKNYVMLKLLGQELTFD VDLSTLPCGENGALYLSEMSATGGRNEYNT
                  *****

Sequenciamento GGAEYGSYGCD AQCPVIAWKN GTLNTSGASYCCNEMDILEANSRANSYTPHPCSATDCDK
Banco de dados  GGAEYGSYGCD AQCPVIAWKN GTLNTSGASYCCNEMDILEANSRANSYTPHPCSATDCDK
                  *****

Sequenciamento GGCGFNPYALGQKSYWGPGGTVDTSKPFTITTTQFITDDGTTTGT LSEIRRQYMQNGKVIA
Banco de dados  GGCGFNPYALGQKSYWGPGGTVDTSKPFTITTTQFITNDGTTTGT LSEIRRQYMQNGKVIA
                  *****:*****

Sequenciamento NAVSSTGVNSITEDWCTSV DGSAA TFGGLTTMGKALGRGMVLIFSIWNDASGFMNWLD SG
Banco de dados  NAVSSTGVNSITEDWCTSV DGSAA TFGGLTTMGKALGRGMVLIFSIWNDASGFMNWLD SG
                  *****

Sequenciamento NAGPCSSTEGNPD LIKAQNPTTHVVF SNIRWGDIGSTFKGSDGSVTTTTSTTSTKTTTST
Banco de dados  NAGPCSSTEGNPD LIKAQNPTTHVVF SNIRWGDIGSTFKGSDGSVTTTTSTTSTKTTTST
                  *****

Sequenciamento APGPTQTHYGQCGGQGW TGPTACASPYTCQVLNPWYSQCL
Banco de dados  APGPTQTHYGQCGGQGW TGPTACASPYTCQVLNPWYSQCL
                  *****

```

Sequenciamento do gene *Afcel6A* clonado em pPICZaA

```

Sequenciamento -----QQTVWGQCGGQGWSGPTSCVAGAACSTLNPYYAQCI PGATA
Banco de dados MKHLASSIALTLLLPAVQAQQTVWGQCGGQGWSGPTSCVAGAACSTLNPYYAQCI PGATA
                *****

Sequenciamento TSTTLTTTTAATTTTSQTTTKPTTTGPTTSAPT V TASGNPFSGYQLYANPYYSSEVHTLAM
Banco de dados TSTTLTTTTAATTTTSQTTTKPTTTGPTTSAPT V TASGNPFSGYQLYANPYYSSEVHTLAM
                *****

Sequenciamento PSLPSSLQPKASAVAEVPSFVWLDVAAKVPTMGTYLADIQAKNKAGANPPIAGIFVVYDL
Banco de dados PSLPSSLQPKASAVAEVPSFVWLDVAAKVPTMGTYLADIQAKNKAGANPPIAGIFVVYDL
                *****

Sequenciamento PDRDCAALASNGEYSIANNGVANYKAYIDAIRAQLVKYSDVHTILVIEPDSL ANLVTNLN
Banco de dados PDRDCAALASNGEYSIANNGVANYKAYIDAIRAQLVKYSDVHTILVIEPDSL ANLVTNLN
                *****

Sequenciamento VAKCANAQSAYLECVDYALKQLNLPNVAMYLDAGHAGWLGWPANLGPAATLFAKVYTDAG
Banco de dados VAKCANAQSAYLECVDYALKQLNLPNVAMYLDAGHAGWLGWPANLGPAATLFAKVYTDAG
                *****

Sequenciamento SPAAVRGLATNVANYNAWSLSTCPSYTGQDPNCDEKKYINAMAPLLKEAGFDAHFIMDTS
Banco de dados SPAAVRGLATNVANYNAWSLSTCPSYTGQDPNCDEKKYINAMAPLLKEAGFDAHFIMDTS
                *****

Sequenciamento RNGVQPTKQNAWGDWCNVIGTGFGVRPSTNTGDPLQDAFVWIKPGGESDGT SNSTSPRYD
Banco de dados RNGVQPTKQNAWGDWCNVIGTGFGVRPSTNTGDPLQDAFVWIKPGGESDGT SNSTSPRYD
                *****

Sequenciamento AHCGYSDALQPAPEAGTWFAQAYFEQLLTNANPSF
Banco de dados AHCGYSDALQPAPEAGTWFAQAYFEQLLTNANPSF
                *****

```

Sequenciamento do gene *Af-xyIA* clonado em pPICZaA

```

Sequenciamento -----AGLNTAAKAKGLKYFGSATDNPELTD SAYVAQLSNTDDFGQ
Banco de dados  MVHLSSLAAALAAALPLVYGAGLNTAAKAKGLKYFGSATDNPELTD SAYVAQLSNTDDFGQ
                  *****

Sequenciamento  ITPGNSMKWDATEPSQNSFSFANGDAVVNLANKNGQLMRCHTLVWHSQLPNWVSSGSWTN
Banco de dados  ITPGNSMKWDATEPSQNSFSFANGDAVVNLANKNGQLMRCHTLVWHSQLPNWVSSGSWTN
                  *****

Sequenciamento  ATLLAAMKNHITNVVTHYKGKCYAWDVVNEALNEDGTFRNSVFYQIIIGPAYIPIAFATAA
Banco de dados  ATLLAAMKNHITNVVTHYKGKCYAWDVVNEALNEDGTFRNSVFYQIIIGPAYIPIAFATAA
                  *****

Sequenciamento  AADPDVKLYYNDYNIEYSGAKATAAQNIVKMIKAYGAKIDGVGLQAHFIVGSTPSQSDLT
Banco de dados  AADPDVKLYYNDYNIEYSGAKATAAQNIVKMIKAYGAKIDGVGLQAHFIVGSTPSQSDLT
                  *****

Sequenciamento  TVLKGYTALGVEVAYTELDIRMQLPSTAAKLAQQSTDFQGVAACVSTTGCVGVTIWDWT
Banco de dados  TVLKGYTALGVEVAYTELDIRMQLPSTAAKLAQQSTDFQGVAACVSTTGCVGVTIWDWT
                  *****

Sequenciamento  DKYSWVPSVFQGYGAPLPWDENYVKKPAYDGLMAGLGASGSGTTTTTTTTTTSTTTGGTDPT
Banco de dados  DKYSWVPSVFQGYGAPLPWDENYVKKPAYDGLMAGLGASGSGTTTTTTTTTTSTTTGGTDPT
                  *****

Sequenciamento  GVAQKWGQCGGIGWTGPTTCVSGTTCQKLNDWYSQCL
Banco de dados  GVAQKWGQCGGIGWTGPTTCVSGTTCQKLNDWYSQCL
                  *****

```

Anexos

ANEXO A – Mapas de vetores

pGEM®-T Easy (Promega)

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
<i>lac</i> operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Note: Inserts can be sequenced using the pUC/M13 Forward Primer (Cat.# Q5601) or pUC/M13 Reverse Primer (Cat.# Q5421).

pET-28a(+) (Novagen)

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

pPICZαA (Invitrogen)

5' AOX1 promoter region: bases 1-941
 5' AOX1 priming site: bases 855-875
 α-factor signal sequence: bases 941-1207
 Multiple cloning site: bases 1208-1276
 c-myc epitope: bases 1275-1304
 Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1320-1337
 3' AOX1 priming site: bases 1423-1443
 AOX1 transcription termination region: bases 1341-1682
 TEF1 promoter: bases 1683-2093
 EM7 promoter: bases 2095-2162
Sh ble ORF: bases 2163-2537
 CYC1 transcription termination region: bases 2538-2855
 pUC origin: bases 2866-3539 (complementary strand)

* *Pst* I is in Version B only
Cla I is in Version C only

†The two *Xho* I sites in the vector allow the user to clone their gene in frame with the Kex2 cleavage site, resulting in expression of their native gene without additional amino acids at the N-terminus.

5' end of AOX1 mRNA

5' AOX1 priming site

811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG **ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

α -factor signal sequence

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

Xho I*

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

Kex2 signal cleavage

EcoR I Pml I Sfi I BsmB I Asp718 I

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC GAATTCAC GTGGCCCAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

Ste13 signal cleavage

Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I c-myc epitope

1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

polyhistidine tag

1299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

ANEXO B – Artigos científicos publicados

Industrial Crops & Products 170 (2021) 113697

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

A thermophilic, pH-tolerant, and highly active GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* boosted pre-treated sugarcane bagasse saccharification by cellulases

Aline Vianna Bernardi^a, Luis Eduardo Gerolamo^a, Sergio Akira Uyemura^b, Taisa Magnani Dinamarco^{a,*}

^a Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto, Chemistry Department, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^b Faculty of Pharmaceutical Science, Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

GH10 xylanase
Aspergillus fumigatus
 Lignocellulose
 Saccharification
 Synergy
 Central composite rotational design

ABSTRACT

We have heterologously expressed a recombinant GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* Af293 (Af-XYLA) in *Pichia pastoris* X-33 and investigated its biochemical and kinetic properties and its synergy with cellulases during lignocellulose saccharification. Af-XYLA showed optimal activity at 80 °C and pH 5–7, and it withstood a temperature of 50 °C and pH 4–8 for 72 h with about 50 % and 80 % of its maximal activity, respectively, in the absence of substrate. Kinetic assays revealed that it presented the highest V_{max} (35,756 U mg⁻¹ at 50 °C and 88,082 U mg⁻¹ at 80 °C) and k_{cat}/K_M (15,456 mL mg⁻¹ s⁻¹ at 50 °C and 15,081 mL mg⁻¹ s⁻¹ at 80 °C) constants among fungal GH10 xylanases. Af-XYLA was xylose- and glucose-tolerant and displayed >70 % activity at 10 % (v/v) ethanol. Few additives affected Af-XYLA negatively, and the surfactants Tween 20, Triton X-100, and SLS and the reducing agents DTT and β-mercaptoethanol improved enzyme performance by 28 %, 11 %, 8 %, 44 %, and 32 %, respectively. We applied a 3-factor Central Composite Rotational Design (CCRD) to optimize important parameters for biomass saccharification and thus maximize the reducing sugars yields obtained from sugarcane exploded bagasse (SEB) and sugarcane delignified bagasse (SDB) hydrolyses. We carried out synergism assays under the previously determined optimal concentrations of Celluclast 1.5®L (1.8 FPU g⁻¹), Af-XYLA (3.75 µg g⁻¹), and Tween 20 (0.75 % v/v). Af-XYLA boosted SEB and SDB hydrolyses by cellulases by 155 % and 277 %, respectively, after 48 h. On the basis of the unique properties of Af-XYLA, it is a robust enzyme for application in biorefineries.

1. Introduction

Lignocellulose represents a promising inexhaustible source of raw material for bio-based chemicals (e.g., xylooligosaccharides and polymers) and biofuels (e.g., bioethanol and biodiesel), which are in high demand (Evangelista et al., 2018; Vanitjinda et al., 2019; Wu et al., 2019). It is chiefly composed by cellulose (40–50 %), hemicellulose (25–30 %), and lignin (15–20 %), which together configure the complex and recalcitrant cross-linked structure of plant cell wall biomass (Song et al., 2016; Wu et al., 2020; Zhang et al., 2020; Zhou et al., 2018).

Xylan is the major component of hemicellulose, so it is the second most abundant polysaccharide in nature (Chang et al., 2017; Li et al., 2019b). It consists of a linear backbone of 1,4-linked β-D-xylopyranose

units, with D-glucuronic acid, L-arabinose, or other branches attached to the xylose residues at various levels (Mhiri et al., 2020; Monclaro et al., 2019; Uday et al., 2017).

Effective xylan depolymerization is a prerequisite for lignocellulosic biomass to be properly exploited (Uday et al., 2017). Due to the heterogeneous chemical structure of xylan, its breakdown requires a repertoire of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) acting synergistically, including the backbone-hydrolyzing enzymes endo-β-1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) and β-xylosidases (EC 3.2.1.37), and side-chain cleaving enzymes such as α-glucuronidases (EC 3.2.1.139), α-L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), acetyl xylan- (EC 3.1.1.72), and ferulic/coumaric acid esterases (EC 3.1.1.73) (Chen et al., 2019b; Liew et al., 2019; Monclaro et al., 2019; Saleh et al., 2021; Uday et al., 2017;

* Corresponding author.

E-mail addresses: alinevbernardi@gmail.com, aline.bernardi@usp.br (A.V. Bernardi), gerolamo00@hotmail.com, luis.gerolamo@usp.br (L.E. Gerolamo), suyemura@fclrp.usp.br (S.A. Uyemura), tdinamarco@fclrp.usp.br (T.M. Dinamarco).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113697>

Received 19 February 2021; Received in revised form 6 May 2021; Accepted 31 May 2021

Available online 10 June 2021

0926-6690/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Ullah et al., 2019).

Among these enzymes, xylanases are key biocatalysts that promote the initial attack on the internal β -1,4-glycosidic bonds of xylan, hydrolyzing it into xylooligosaccharides with different degrees of polymerization (DP) (Chen et al., 2019b; Evangelista et al., 2018; Han et al., 2019; Haq and Akram, 2019). These high-value products can be potentially exploited as prebiotics or still be converted into D-xylose for use in 2 G ethanol, xylitol, and lactic acid production (Evangelista et al., 2018; Turner et al., 2015; Wu et al., 2019). Also, xylanases play relevant roles in other manufacturing processes, such as juice clarification, beer finishing, bread making, industrial waste treatment, plant fiber degumming for the textile industry, and paper pulp bleaching, where they act as an ecofriendly substitute for chemicals, justifying the great interest in these enzymes (Chen et al., 2019b; de Amo et al., 2019; Evangelista et al., 2018). However, these reactions are usually carried out at higher temperatures and acid/alkaline environments, limiting the industrial applications of xylanases (Li et al., 2019a; Saleem et al., 2021; Takita et al., 2019; Xing et al., 2021; Yang et al., 2020).

Most native xylanases are mesophilic, do not withstand harsh conditions, and only work well within specific ranges of temperature, pH, and ionic strength (Han et al., 2019; Maitan-Alfenas et al., 2016; Saleem et al., 2021; Xu et al., 2016; Yang et al., 2020). They are little stable to operational conditions and may be inhibited by products, which negatively affect process yield and demand high enzymatic loadings (Chen et al., 2019a; Meleiro et al., 2018; Soozanipour et al., 2015; Vazquez-Ortega et al., 2018). Therefore, bioprospecting for xylanases with more appealing biotechnological characteristics and improving the properties of naturally occurring enzymes through immobilization or genetic engineering tools have been important and necessary focuses of research (Kumar et al., 2018, 2016; Pasin et al., 2020).

According to the CAZy database (www.cazy.org), several families of glycoside hydrolases (GH) are correlated with xylanases (e.g. 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62, 98 and 141), but the overwhelming majority is represented by members of the GH10 and GH11 families (Joshi et al., 2020; Liew et al., 2019; Malgas and Pletschke, 2019). Both families catalyze hydrolysis through a retention mechanism involving two glutamate residues, but GH11 xylanases generally exhibit higher pIs, lower molecular weights (<30 kDa), and superior catalytic efficiencies as compared to GH10 xylanases. Nevertheless, GH10 xylanases usually present greater thermostability and can act on a wide variety of xylans. Besides that, GH10 xylanases display better performance than GH11 when associated with cellulases during biomass hydrolysis, which makes them more suitable targets for industrial purposes (He et al., 2019; Hu and Saddler, 2018; Joshi et al., 2020; Li et al., 2019a; Maitan-Alfenas et al., 2016; van Gool et al., 2013; Yang et al., 2020).

Filamentous fungi are the best at secreting xylanases and other enzymes required for biomass degradation (i.e., cellulases, hemicellulases, and lignases), but thermophilic fungi are of particular interest (Carli et al., 2016; Chen et al., 2019b; de Amo et al., 2019; Kumar et al., 2018; Liu et al., 2019; Miao et al., 2018; Uday et al., 2017). Numerous thermophilic fungi have been found to be efficient sources of thermo-alkali stable xylanases (Chadha et al., 2019). *Myceliophthora thermophila* contains 12 genes coding for xylanases (distributed into families 11 and 12), some of which have already been characterized as highly thermally stable and able to act under extreme alkaline conditions (Chadha et al., 2019; Karnaouri et al., 2014a). Also, *Thermomyces lanuginosus* is a well-known producer of high levels of thermostable, alkaline-active, and cellulase-free xylanases (48,000 U g⁻¹ under solid substrate fermentation) (Chadha et al., 2019; Mathibe et al., 2020). Thermostable xylanases produced by *Malbranchea flava* boosted pulp bleaching and lignocellulose saccharification by cellulases (Chadha et al., 2019; Ghatore et al., 2006; Sharma et al., 2016). Likewise, the thermophilic species *Thermoascus aurantiacus* and *Hemicella insolens* are potential producers of xylanases

(Chadha et al., 2019). In addition to the aforementioned fungi, *Aspergillus fumigatus* has proven an excellent candidate to produce thermostable CAZymes, including xylanases, with great enzymatic activities (Bernardi et al., 2021, 2019, 2018; Chen et al., 2019b; Gouvêa et al., 2019). However, even though fungi can produce enzymes in higher amounts than other microbes, their expression levels do not always satisfy industrial requirements (de Amo et al., 2019; Han et al., 2019). In this context, expressing enzymes in heterologous systems has become an advantageous alternative. In this scenario, the yeast *Pichia pastoris* stands out as a well-described and broadly applied expression host that can produce pronounced amounts of soluble, correctly folded, and almost pure proteins (de Amo et al., 2019; Maitan-Alfenas et al., 2016).

Bearing in mind the essential contribution of xylanases for efficient and cost-effective use of biomass and its wide industrial application, we have cloned and expressed a GH10 xylanase (Af-XYLA), identified during the transcriptome and secretome analysis of *A. fumigatus* grown in sugarcane exploded bagasse (SEB) (de Gouvêa et al., 2018), in *P. pastoris* for further characterization. The recombinant enzyme presented optimum temperature of 80 °C, great stability to almost all the evaluated reaction conditions, and substantial catalytic efficiency. Moreover, it considerably boosted the saccharification yields by Celluclast® 1.5 L. These unique properties of Af-XYLA indicated that it is a robust biocatalyzer for application in biorefinery processes.

2. Materials and methods

2.1. Strains, culture media, vectors, and materials

Aspergillus fumigatus Af293 was grown in Yeast-Agar-Glucose (YAG) medium [2.0 % (w/v) dextrose, 2.0 % (w/v) agar, 0.5 % (w/v) yeast extract, and 0.1 % (v/v) trace elements] at 37 °C for two days, to obtain a fresh conidium suspension. The conidia were inoculated to a final concentration of 1×10^8 per 50 mL of YNB medium [1X salts solution, 0.1 % (v/v) trace elements, and 0.05 % (w/v) yeast extract] containing 1% (w/v) fructose and incubated at 37 °C and 200 rpm for 16 h. Next, the mycelia were harvested, washed, and transferred to YNB medium containing 1% (w/v) SEB at 37 °C and 200 rpm for 24 h. Then, the mycelia were harvested for RNA extraction.

The plasmid pPICZαA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for gene cloning, sequencing, and expression. *Escherichia coli* DH10β grown at 37 °C and 200 rpm in low salt Luria-Bertani medium supplemented with zeocin (50 µg mL⁻¹) was used to propagate the recombinant vector Af-xyLA/pPICZαA. *Pichia pastoris* X-33 cells harboring the recombinant expression vector Af-xyLA/pPICZαA were used for heterologous protein production. The growth conditions are described in the EasySelect™ *Pichia* Expression Kit manual (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Beechwood xylan and tamarind seed xyloglucan were acquired from Megazyme (Megazyme International, Bray, Co., Wicklow, Ireland). Avicel® PH-101 and low-viscosity CM-Cellulose (CMC) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

SEB was provided by Professor João Atílio Jorge (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil). Sugarcane delignified bagasse (SDB) was obtained by chemical treatment and provided by Professor Richard John Ward (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil).

2.2. RNA extraction, cDNA synthesis, and gene amplification

After growth for 24 h in SEB-containing medium, the mycelia were harvested by centrifugation for RNA isolation with the Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA by using SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Then, cDNA was employed as template for PCR amplification of the ORF corresponding to the Af-XYLA-encoding gene (Afu6g13610), without the signal peptide-encoding region. Specific primer sequences

containing overlapping regions between the pPICZαA vector and the insert were applied (F: 5′- GAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTGCTGGCCTGAACACA -3′ and R: 5′- ATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTAGCAGGCACTGTGAGTA -3′; overlapping sites in bold). The amplification reaction was performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); the following thermo cycling conditions were used: 98 °C for 30 s; 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; and 72 °C for 10 min. The PCR product was analyzed by electrophoresis and purified from 1% (w/v) agarose gel by employing the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany).

2.3. Cloning, transformation of *P. pastoris*, and screening for recombinant transformants

The amplified *Af-xyLA* fragment was cloned into pPICZαA, previously digested with the restriction enzymes *EcoRI* and *XbaI*, by the Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) method (Quan and Tian, 2011). The CPEC reaction was performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific); the thermo cycling conditions were as follows: 98 °C for 30 s; 35 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min 30 s; and 72 °C for 10 min. The cloning product was transformed into chemically competent *E. coli* DH10β cells, and the resistant transformants were selected with zeocin (50 μg mL⁻¹). Next, the *Af-xyLA*/pPICZαA recombinant plasmid was linearized with *PmeI* and transformed into competent *P. pastoris* X-33 cells by electroporation, according to the EasySelect™ *Pichia* Expression Kit manual (Invitrogen). *P. pastoris* recombinant clones were screened by Zeocin resistance.

2.4. Heterologous expression of *Af-XYLA* in *P. pastoris* and protein purification

A Zeocin-resistant *P. pastoris* transformant was selected to produce the protein. The recombinant yeast was cultivated in buffered glycerol-complex medium (BMGY) [2% (w/v) peptone, 1.34 % (w/v) yeast nitrogen base, 1% (w/v) yeast extract, 1% (v/v) glycerol, 4 × 10⁻⁵ % (w/v) biotin, 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0] at 30 °C and 240 rpm until the culture reached log-phase growth (O.D._{600nm} = 2–6). Then, for *Af-XYLA* heterologous expression, the cells were re-suspended in buffered methanol-complex medium (BMMY) [2% (w/v) peptone, 1% (v/v) methanol, 1.34 % (w/v) yeast nitrogen base, 1% (w/v) yeast extract, 4 × 10⁻⁵ % (w/v) biotin, 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0] to an O.D._{600nm} = 1. To maintain expression levels, methanol (1% (v/v)) was added to the medium at 24-h intervals for six days. After this time, the supernatant containing secreted recombinant *Af-XYLA* was harvested from grown culture and concentrated 10 times by using an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter—10 kDa cutoff (Millipore, Burlington, MA, USA).

For protein purification, the concentrate was re-suspended in 20 mM sodium phosphate buffer containing 500 mM NaCl (pH 7.4) and loaded onto Ni Sepharose 6 Fast Flow resin (Ge Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). To elute the *Af-XYLA* His₆-tagged recombinant, an imidazole gradient from 0 to 500 mM was applied to the column. Protein elution was analyzed by 10 % (w/v) SDS-PAGE. Fractions containing the recombinant enzyme were mixed and buffer-exchanged by using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter - 10 kDa cutoff (Millipore) to remove excess imidazole. The protein concentration was determined by the Greenberg method (Greenberg, 1929).

2.5. Sequence and structural analysis

The signal peptide in *Af-XYLA* was predicted with SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The potential N-glycosylation sites were predicted with the NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Multiple sequence alignment was performed with the Clustal Omega tool (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Homology modeling was performed with the Phyre2 software (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

The three-dimensional structure of the protein modeled from Phyre2 was analyzed with the Swiss PDB viewer. The secondary structures present in the modeled *Af-XYLA* were accounted by checking the Phyre2 results and by running the Kabsch & Sander prediction algorithm (Kabsch and Sander, 1983) in the Discovery Studio visualizer.

2.6. Analysis by circular dichroism (CD) and intrinsic tryptophan fluorescence emission (ITFE)

The Circular Dichroism (CD) spectra were obtained on a JASCO-810 spectropolarimeter. *Af-XYLA* (0.000625 μg mL⁻¹) diluted in 20 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.4) was analyzed between 190 and 250 nm in 0.1-cm quartz cuvettes (loaded with 200 μL) after preheating at 25, 40, 50, 60, 70, 80, or 90 °C for 30 min. The readings were performed in quadruplicate measurements at scan rate, data interval, band width, and D.I.T. values of 50 nm min⁻¹, 1 nm, 3 nm, and 1 s, respectively. After the baseline was corrected and the blank was subtracted, millidegree (mdeg) units were converted to Δε in M⁻¹ cm⁻¹ according to the equation:

$$\Delta\epsilon = \frac{\theta \cdot MRW}{d \cdot c \cdot 32980}$$

where MRW (106.4 Da for *Af-XYLA*) is the protein mean residual weight, calculated by dividing the molecular weight in Da by the number of residues-1; θ is the ellipticity value originally given by the equipment (mdeg); d is the path length (cm); and c is the concentration (mg mL⁻¹). All the collected treated spectra were analyzed with the BeStSel free server (Micsonai et al., 2018) to estimate the content of secondary structures.

Intrinsic Tryptophan Fluorescence Emission (ITFE) analysis was performed on the spectrofluorometer HITACHI-F4500. By using the same concentration and sample treatment employed for CD analysis, 295 nm was selected to excite the tryptophan residues in *Af-XYLA*, and the fluorescent emissions were detected between 300 and 450 nm. The samples (1 mL) were placed in 1.0-cm quartz cuvettes, and the readings were conducted at scan rate of 240 nm min⁻¹ and data interval of 0.2 nm. The blank was subtracted to correct the collected spectra.

To determine the apparent T_m (melting temperature), the first derivatives of the plots of ellipticity registered at 205 nm (from CD) vs temperature and maxima wavelength (from ITFE) vs temperature were calculated with the OriginPro 9.0 software. Both plots were fitted by using the Boltzmann function. All the CD and ITFE analyzed graphs were previously smoothed with the Savitzky-Golay filter (Savitzky and Golay, 1964).

2.7. Zymogram analysis and *Af-XYLA* deglycosylation

The *Af-XYLA* activity was evaluated by Zymogram on 10 % (w/v) polyacrylamide gel containing 0.5 % (w/v) xylan (Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland). Before being loaded onto the gel, 10 μg of enzyme was mixed with a non-reducing 5x sample buffer. After electrophoresis, the gel was soaked twice in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 1% (v/v) Triton X-100 for 30 min, to remove SDS and to allow the enzyme to refold. The gel was soaked in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) for 15 min for washing and incubated in the same buffer at 50 °C for 30 min. Finally, the gel was stained with 0.1 % (w/v) Congo red solution for 30 min and de-stained with 1 M NaCl until pale-red hydrolysis zones appeared against a red background.

Recombinant *Af-XYLA* was deglycosylated by using Endoglycosidase H (Endo H, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) in non-denaturing conditions, as per the manufacturer's procedure. The resulting enzyme was further analyzed by SDS-PAGE and compared to the non-treated one.

2.8. Endo-β-1,4-xylanase activity assay

The *Af-XYLA* activity was determined by measuring the released reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller,

1959). Briefly, the reaction mixture consisting of 1% (w/v) beechwood xylan in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) was incubated at 80 °C for 10 min. The enzyme action was stopped by adding an equal volume of DNS reagent. Then, the mixture was boiled for 5 min and cooled down, and the absorbance was measured at 540 nm. One unit of endoxylanase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol of reducing sugar from the substrate per minute. Each assay was carried out in triplicate.

2.9. pH and temperature profiles

The optimum pH for Af-XYLA activity was measured from 3.0 to 8.0, in Mcllvaine buffer (citric acid- Na_2HPO_4), at 50 °C. The optimum temperature for Af-XYLA activity was examined from 30 to 90 °C.

pH stability was estimated by measuring the residual enzymatic activity under standard conditions (pH 6.0, 80 °C, and 10 min) after pre-incubation of the enzyme without substrate in Mcllvaine buffers pH 3.0–8.0 at 4 °C for up to 72 h. To determine the thermal stability of Af-XYLA, it was pre-incubated from 30 to 90 °C for different times, without the presence of substrate. To measure the residual activity, the activity of the enzyme with no pre-incubation was considered 100 %.

2.10. Influence of additives on Af-XYLA activity

The effect of different metal ions on the Af-XYLA activity was determined by adding Mn^{2+} , Co^{+2} , Ca^{2+} , Fe^{+2} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , NH_4^+ , K^+ , or Ag^+ to a final concentration of 5 mM in the reaction mixture. In the same way, the effect of adding the chemicals EDTA, SDS, SLS, Tween 20, Triton X-100, β-mercaptoethanol, DTT, ascorbic acid, or DMSO was also tested. The reactions were performed under standard conditions and stopped by DNS addition. The control reaction (100 % activity) was carried out without any additive. The relative activity was estimated by comparison with the control.

2.11. Effects of monosaccharides and ethanol on Af-XYLA activity

The effects of D-xylose and D-glucose on the recombinant xylanase activity were determined in the presence of increasing concentrations (10–250 mM) of these sugars; the chromogenic substrate azo-xylan from beechwood (Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland) was used. The enzymatic assays were performed in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) at 40 °C for 10 min, according to the manufacturer's instructions with slight modifications. The reactions were stopped by adding 2.5 volumes of absolute ethanol. The supernatants were harvested by centrifugation at $1700 \times g$ for 10 min, and the absorbances were measured at 590 nm.

To determine the effect of ethanol, increasing concentrations (0.5–50 % (v/v)) of this reagent were added to the reactions. The enzymatic assays were performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% (w/v) beechwood xylan at 50 °C for 10 min. The endoxylanase relative activities were calculated by measuring the released reducing sugars by the DNS method.

The activity of the enzyme in the absence of xylose, glucose, or ethanol was considered 100 %.

2.12. Substrate specificity

The Af-XYLA specificity for different substrates was determined by measuring the xylanase activity toward 0.5 % (w/v) low-viscosity CM-cellulose, xyloglucan from tamarind seed, or Avicel® PH-101; the activity toward beechwood xylan was considered as 100 %. Enzymatic reactions were carried out as described in 2.8.

2.13. Kinetic assays

The Af-XYLA kinetic parameters (K_M , V_{max} , and k_{cat}) were

Table 1

Coded and actual values of independent variable levels.

Variables	Levels				
	−1.68	−1	0	+1	+1.68
A - Tween 20 (% (v/v))	0	0.2	0.5	0.8	1
B - Celluclast® 1.5 L (FPU g ^{−1})	0.2	0.5	1	1.5	1.8
C - Af-XYLA (μg g ^{−1})	0	1	2.5	4	5

determined for beechwood xylan (0.5–30 mg mL^{−1}) as substrate. The reactions were performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) at two temperatures, 50 and 80 °C, for 10 min. The released reducing sugars were measured by the DNS method. The parameters were calculated by Michaelis-Menten non-linear regression with the Origin-Pro 9.0 software.

2.14. CCRD approach for optimization of sugarcane bagasse hydrolysis

A Central Composite Rotational Design (CCRD) of experiments was used to investigate the influence of the parameters A – Tween 20 (% (v/v)), B – Celluclast® 1.5 L (FPU/g of substrate), and C – Af-XYLA (μg/g of substrate) on SEB and SDB hydrolysis and to find the most suitable values of these three operational factors for optimum yield of reducing sugars.

The factors A, B, and C were considered independent variables, and the percentage of reducing sugars was the response (dependent variable). The operational parameters were examined at five different levels (−α, −1, 0, +1, +α), whose coded and actual values are presented in Table 1.

The hydrolysis reactions were performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% (w/v) of SEB or SDB at 50 °C and 1000 rpm for 48 h. The reducing sugars released in each assay were measured by the DNS method, and the percentage yields were calculated by using the following Eq. (1):

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Reducing sugars obtained from biomass hydrolysis (mg)}}{\text{Amount of biomass used (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

The mathematical model to predict the response variable was fitted as a second-order polynomial Eq. (2):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

where y is the predicted mean response, β_0 is the constant term of the model, β_i are the coefficients of the linear terms, β_{ii} are the coefficients of the quadratic terms, β_{ij} are the coefficients of the interaction terms, and ε is the random error component that is determined by fitting the model to the data.

An Analysis of Variance (ANOVA $p < 0.01$) was performed by using the STATISTICA 12 software to clarify the influence of independent variables and their interactions on the response and to find out whether the mathematical model was statically significant and presented an error (lack of fit). Thus, with a significant and predictive regression, the response surfaces could be obtained and then used to optimize the model.

2.15. Synergy of Af-XYLA with Celluclast® 1.5 L cocktail

The effect of the synergistic activity between the recombinant Af-XYLA from *A. fumigatus* and the commercial cellulases from *Trichoderma reesei* was evaluated during pre-treated sugarcane bagasse hydrolysis. The reactions were conducted in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% (w/v) SEB or SDB at 50 °C and 1000 rpm for 24 or 48 h. The optimum values for Tween 20 (0.75 % (v/v)), Celluclast® 1.5 L

Fig. 1. Af-XYLA three-dimensional structure predicted by homology modeling (97 % of residues modelled at >90 % confidence) performed with the Phyre2 software and edited with the Swiss PDB Viewer tool. Helices, sheets, and coils are highlighted in pink, lilac, and grey, respectively. Putative catalytic glutamate residues and potential N-glycosylation site are highlighted in red and orange, respectively. Cysteine residues apt to form disulfide bonds (C100, C142, C285, C291, C380, and C396) are highlighted in green, and the S—S bonds are highlighted in yellow.

(1.8 FPU g⁻¹), and Af-XYLA (3.75 µg g⁻¹), previously stipulated by Response Surface Methodology (RSM) statistical analysis, were used in the mixtures. The percent hydrolysis yields were determined by estimating the released reducing sugars by the DNS method. The reported results represent the means ± SD calculated from at least three experimental replicates.

2.16. Reproducibility of the results

All the data are the mean of at least three independent experiments and show consistent results.

3. Results and discussion

3.1. Af-XYLA sequence and structural analysis

The *Af-xyLA* gene from *A. fumigatus* (Afu6g13610, Gene ID 3508551, GenBank access number XM_746144.1) has a 1194 bp ORF encoding an endo-β-1,4-xylanase (Af-XYLA) with 397 amino acid residues and a theoretical molecular weight of 42.14 kDa (<http://www.aspergillusgenome.org/>; <https://www.uniprot.org/uniprot/Q4WLG5>). On the basis of sequence similarity and according to CAZy database, we classified recombinant Af-XYLA into glycoside hydrolase (GH) family 10. Xylanases belonging to this family are less selective and hydrolyze substituted forms of xylans as well as small xylooligosaccharides (Mhiri et al., 2020; Monclaro et al., 2019; Van Den Brink and De Vries, 2011).

The *A. fumigatus* Af293 genome contains six genes coding for endoxylanases, being three for GH10 (Afu6g13610, Afu4g09480, and Afu3g15210) and three for GH11 (Afu3g00320, Afu3g00470, and Afu6g12210). Af-XYLA is the only xylanase linked to a carbohydrate-binding module (CBM1) at C-terminal residues 361–397 (GVAQKWGQCGGIGWTGPTTCVSGTTCQKLNWDWYSQCL) (Segato et al., 2014). CBMs are non-catalytic domains that assist enzymes in recognizing and binding to their respective substrates. CBMs increase the effective concentrations of enzymes around the target surface, increasing their catalytic efficiencies (Couturier et al., 2011; Guillén et al., 2010; Inoue et al., 2015).

In GH10 xylanases, these modular structures are typically linked to the hydrolase domain by a flexible linker region (Miao et al., 2018). Xylanase-related CBMs (e.g., CBM1, CBM2, CBM6, and CBM22) can play distinct polysaccharide-binding functions. In particular, the CBM1 family targets binding to crystalline cellulose surfaces (Miao et al., 2018). Cellulose-binding modules impact hemicellulase adsorption and action positively because cellulose and hemicellulose portions are very close in the plant cell wall matrix (Miao et al., 2018; Zhang et al., 2013).

Bioinformatics analysis of the Af-XYLA sequence revealed a signal peptide at N-terminal residues 1–19 (MVHLSLAALAAALPLVYG). We

Table 2

Percentage of secondary structures present in Af-XYLA determined with the BeStSel server on the basis of the CD spectra obtained at 25 °C and predictions with the Phyre2 server and Kabsch & Sander method on the basis of enzyme sequence.

	BeStSel (CD)	Phyre2	Kabsch & Sander
α-helix (%)	29.1	37.0	37.6
β-strand (%)	22.8	18.0	14.0
Turns (%)	9.1	–	–
Others/disordered (%)	39.0	45.0	48.4

removed this signal peptide before cloning *Af-xyLA* into the pPICZaA vector, in fusion with the α factor sequence (an essential step to obtain an extracellular recombinant enzyme). Also, the analysis indicated a potential N-glycosylation site at asparagine residue N120. The presence of N-glycans at different sites of the structure may influence the protein in different ways, including its secretion, folding, stability, and other enzymatic characteristics (Chang et al., 2017). Alignment of the Af-XYLA amino acid sequence with some GH10 xylanases from other fungi (Supplementary Fig. 1) revealed a percent identity of 62.28 %, 60.30 %, 48.43 %, 46.67 %, 45.48 %, and 43.49 % with the enzymes from *T. cellulolyticus* (Inoue et al., 2015), *G. trabeum* (Kim et al., 2014), *T. aurantiacus* (Natesh et al., 1999), *A. terreus* (Chantasingh et al., 2006), *T. leycettanus* (Wang et al., 2016), and *A. fumigatus* (Chang et al., 2017), respectively.

Furthermore, the alignment revealed some conserved regions, so we were able to predict the two putative catalytic residues—E150 and E257. Xylanases belonging to the GH10 and GH11 families usually act through an acid/base mechanism that generally involves two glutamate residues (Hoffmam et al., 2016; Segato et al., 2014).

We predicted the three-dimensional structure of Af-XYLA with the Phyre2 software and manipulated it by using Swiss-PDB viewer editing tools (Fig. 1). As expected for a GH10 xylanase, Af-XYLA exhibits an eight-fold TIM barrel structure [(β/α)₈], consisting of eight α-helices and eight β-sheets around a deep groove active site. This structure is consistent with its endo mode of catalysis (Liew et al., 2019; Segato et al., 2014; Ullah et al., 2019). The three disulfide bonds highlighted in yellow evidence the presence of six cysteine residues. These covalent bonds are important post-translational modifications that interfere in proper protein function, folding, and stability (Lakbub et al., 2018). The two putative catalytic residues (in red) and the asparagine with potential to be glycosylated (in orange) are also highlighted.

Additionally, analysis of the spectrum obtained by Far-UV CD at 25 °C with the BeStSel server revealed that Af-XYLA is composed of α-helices (29.1 %), β-strands (22.8 %), turns (9.1 %), and disordered structures and other structures (39.0 %) (Table 2). Compared to other

Fig. 2. *Af*-XYLA optimal conditions and stability. a) pH curve. b) Temperature curve. c) pH stability. d) Thermal stability. e) Stability at 50 °C.

predictions (Phyre2 model and Kabsch & Sander method (Kabsch and Sander, 1983)), the slightly super- or underestimated α -helix and β -strand structures, respectively, are noteworthy even though they are relatively close to the CD results. In fact, the similar proportions are related to the TIM barrel core, as observed in the crystallographic structure of *CjXyn10C* (PDB:1US2) (Pell et al., 2004), which presents 36.7 % α -helices and 22.9 % β -strands and was used as basis for *Af*-XYLA 3D modelling.

3.2. SDS-PAGE and Zymogram analysis of purified *Af*-XYLA

We cloned the *Af*-xylA gene into the pPICZaA vector and expressed it in *Pichia pastoris* X-33 under control of the AOX1 promoter. After

induction for six days with 1% (v/v) methanol, we collected the culture supernatant by centrifugation and purified the recombinant *Af*-XYLA by one-step nickel affinity chromatography. We analyzed all the fractions collected during purification by SDS-PAGE (Supplementary Fig. 2 a). *Af*-XYLA elution started with 10 mM imidazole and finished with 250 mM imidazole, yielding 1.0 mg mL⁻¹. The electrophoretic band of pure *Af*-XYLA was slightly higher than expected for its estimated molecular weight (42 kDa), possibly due to the presence of N-linked glycans. To clarify this, we deglycosylated *Af*-XYLA by treating it with Endo H. In fact, we verified a subtle difference in the protein band migration (Supplementary Fig. 2b), which agreed with the previous prediction of only one site with potential for N-glycosylation in the *Af*-XYLA structure.

We started to characterize the *Af*-XYLA enzymatic activity with a

Table 3
Comparison of biochemical properties and kinetics of GH10 xylanases from different fungi.

Source Organism	Protein name	Expression System	Substrate	V _{max}	K _M	k _{cat}	k _{cat} /K _M	Optimal T	Optimal pH	Thermal stability	pH stability	Ref
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	XYLA	<i>Pichia pastoris</i> X-33	Beechwood xylan ^a	35,756 ± 1279 U mg ⁻¹	1.62 ± 0.19 mg mL ⁻¹	25,039 s ⁻¹	15,456 mL mg ⁻¹ s ⁻¹	80 °C	pH 5.0–7.0	About 80 % of residual activity after 16 h at 40 and 50 °C, 50 % after 5 h and 30 min, respectively, at 60 °C and 70 °C	80 % of residual activity after 72 h at pH 4.0–8.0 (at 4 °C)	This study
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	AF-XYNA	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Birchwood xylan	268 ± 7 U mg ⁻¹	1.3 ± 0.1 mg mL ⁻¹	–	–	75 °C	pH 5.0	> 60 % of relative activity after 1 h at 60 °C, rapid loss of activity at 70 °C	> 69 % of relative activity at pH 3.0–8.0 and more than 46% at pH 9.0–11.0	(Chang et al., 2017)
<i>Talaromyces cellulolyticus</i> CF-2612	Xyl10A	<i>Talaromyces cellulolyticus</i> YP-4	Birchwood xylan	–	2.51 ± 0.42 mg mL ⁻¹	232 ± 12.4 s ⁻¹	92.2 ± 16.2 s ⁻¹ mL ⁻¹	80 °C	pH 5.0	T _m equal to 81 °C	33 % of relative activity at pH 3.4	(Inoue et al., 2015)
<i>Gloeophyllum trabeum</i> KaCC 43,361	Xyl10g	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Beechwood xylan	1.82 mM min ⁻¹ mg ⁻¹	101.91 mM	1941.43 s ⁻¹	–	70 °C	pH 4.0–7.0	Stable below 50 °C, with 62.5 % of residual activity after 24 h, 88% of loss after 30 min at 70 °C	–	(Kim et al., 2014)
<i>Myceliophthora thermophila</i> G1	XylI (Xyn10A)	<i>Myceliophthora thermophila</i> G1	Birch glucuronoxylan	–	–	43 s ⁻¹	–	–	–	No loss after 1 h at 50 °C (pH 5.0 or 7.0) and more than 80 % of activity at 60 °C	–	(Ustinov et al., 2008; van Gool et al., 2013)
			Beech glucuronoxylan	–	–	44 s ⁻¹	–	65–70 °C	pH 5.5–6.0	–	–	
			Oat arabinoxylan	–	–	63 s ⁻¹	–	–	–	–	–	
			Wheat arabinoxylan	–	–	55 s ⁻¹	–	–	–	–	–	
			Birch glucuronoxylan	–	–	28 s ⁻¹	–	–	–	–	–	
			Beech glucuronoxylan	–	–	34 s ⁻¹	–	80–85 °C	pH 6.0–6.5	No loss after 1 h at 50 °C (pH 5.0 or 7.0) and more than 90% of activity at 60 °C	–	
			Oat arabinoxylan	–	–	45 s ⁻¹	–	–	–	–	–	
<i>Aspergillus terre</i> BCC129	BCC129 xylanase	<i>Pichia pastoris</i> KM71	Birchwood xylan	757 ± 1454 U mg ⁻¹	4.8 ± 0.07 mg mL ⁻¹	–	–	60 °C	pH 5.0	90 and 50 % of activity after 20 and 30 min, respectively, at 60 °C; complete inactivation after 10 min at 70 and 80 °C	> 80 % of residual activity after 4 h at pH 4.0–10.0 (at 40 °C)	(Chantasingh et al., 2006)
<i>Talaromyces leycettanus</i> JCM12802	TLXyn10A	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Birchwood xylan	2542 ± 22 U mg ⁻¹	1.01 ± 0.05 mg mL ⁻¹	–	1626 ± 81 mL s ⁻¹ mg ⁻¹	80 °C	pH 4.5	81.7%, 74.8 % and 58.2 % of activity after 1 h at 85, 90 and 95 °C, respectively	> 80 % of residual activity after 1 h at pH 2.0–8.0 (at 37 °C)	(Wang et al., 2016)
<i>Malbranchea pulchella</i>	MpXyn10A	<i>Aspergillus nidulans</i> A773	Birchwood xylan	82 U mg ⁻¹	4.6 mg mL ⁻¹	748 s ⁻¹	162.6 mL mg ⁻¹ s ⁻¹	80 °C	pH 5.5	About 85 % activity after 24 h at 65 °C, 80 % after 1 h at 70 °C	–	(Ribeiro et al., 2014)
<i>Penicillium funiculosus</i>	XynD	<i>Pichia pastoris</i> X-33	Wheat LVAX ^e	–	3.7 ± 0.2 mg mL ⁻¹	399 s ⁻¹	108 s ⁻¹ mL ⁻¹	80 °C	pH 4.0–5.5	No loss after 1 h at 70 °C; lost of about 80 % activity after 10 min at 80 °C	–	(Lafond et al., 2011)
<i>Humicola insolens</i> Y1	XynW XynA XynB	– <i>Pichia pastoris</i> GS115	Birchwood xylan	311.8 U mg ⁻¹ 974.4 U mg ⁻¹	2.8 mM 1.6 mM	2131 min ⁻¹ 654.5 min ⁻¹	–	70 °C 80 °C	pH 6.0	Stable after 1 h at 50 °C	> 90 % of residual activity after 1 h at pH 5.0–10.0 (at 37 °C)	(Du et al., 2013)

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Source Organism	Protein name	Expression System	Substrate	V _{max}	K _M	k _{cat}	k _{cat} /K _M	Optimal T	Optimal pH	Thermal stability	pH stability	Ref
<i>Bispora</i> sp. MEY-1	XynC			306.8 U mg ⁻¹		198.4 min ⁻¹						
				287.7 U mg ⁻¹	2.1 mM	196.1 min ⁻¹		70 °C	pH 6.0			
	XYL10C	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Oat spelt xylan	23,728 U mg ⁻¹	0.98 mg mL ⁻¹	–	–	85 °C	pH 4.5–5.0	No loss after 1 h at 80 °C (t _{1/2} = 45 h); more than 87% of residual activity after 10 min at 90 °C	> 80 % of residual activity after 1 h at pH 1.5–6.0 (at 37 °C)	(Luo et al., 2009)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> RP78	XynA	<i>Aspergillus niger</i> N593	Birchwood xylan	18,744 U mg ⁻¹	1.27 mg mL ⁻¹	–	–	–	–	No significant loss after 30 min at 60 °C; complete inactivation at 70 °C	No significant loss after 2 h at pH 3.0–8.0 (at 30 °C)	(Decelle et al., 2004)
	XynC			–	3.42 ± 0.69 mg mL ⁻¹	–	–	70 °C	pH 4.5			
<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI 756	Xylanase	–	Birchwood arabinoxylan	–	3.71 ± 0.69 mg mL ⁻¹	–	–	75 °C	pH 5.0	About 80 % activity after 1 h at 40–70 °C; 18% at 75 °C	About 90 % of residual activity after 24 h at pH 4.0–10.0; 62% at pH 3.5; 44% at pH 10.5 (at 25 °C)	(Oliveira et al., 2010)
				–	–	–	–	–	–			
<i>Trichoderma</i> sp. K9301	EX1	–	Oat spelt xylan	10.8 x 10 ⁵ M min ⁻¹	20.0 mM	12.8 x 10 ⁶ s ⁻¹	6.41 x 10 ⁵ L mmol ⁻¹ s ⁻¹	–	–			
				7.14 x 10 ⁵ M min ⁻¹	–	–	–	–	–			
				7.94 x 10 ⁵ M min ⁻¹	–	–	–	–	–			
<i>Aspergillus nidulans</i> KK-99	Xylanase	–	Birchwood xylan	–	–	–	–	–	–			
				–	–	–	–	–	–			

^a Kinetic parameters determined at 50 °C.

^b Kinetic parameters determined at 80 °C.

^c Low-viscosity arabinoxylan.

Fig. 3. Far-UV Circular Dichroism (CD) (top) and Intrinsic Tryptophan Fluorescence Emission (ITFE) (bottom) analysis of Af-XylA. Spectra obtained after incubation for 30 min at temperatures from 25 to 90 °C (a and c). The apparent melting temperature T_{mapp} was obtained by the first derivative of (b) ellipticity registered at 205 nm for CD X temperature; and (d) maximum wavelength values from ITFE X temperature plot. Ellipticity and signal intensity values were obtained with 0.0065 mg mL⁻¹ Af-XylA samples in 20 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.4) and 0.1-cm quartz cuvette for CD and 1.0-cm quartz cuvette for ITFE. The mean spectra for each condition were normalized by subtracting the buffer spectrum.

zymogram to investigate the ability of this enzyme to hydrolyze the xylan (0.5 % (w/v)) incorporated into a polyacrylamide gel. Indeed, after staining the gel with Congo Red and then de-staining with NaCl, a pale red band corresponding to the halo of substrate degradation emerged (Supplementary Fig. 3).

3.3. pH and Temperature profiles of Af-XYLA

We investigated the pH- and temperature-dependence of Af-XYLA activity. With beechwood xylan as substrate, the recombinant xylanase presented the highest activity at pH ranging from 5.0 to 7.0; the enzyme retained about 80 % of this activity at pH 4.0 and 8.0. In more acidic condition (pH 3.0), the enzyme lost almost all the activity—only about 20 % activity remained (Fig. 2a). We observed a similar profile when we assessed the recombinant enzyme stability by pre-incubating it at pH ranging from 3.0 to 8.0 in the absence of its substrate. After 72 h at pH 4.0–8.0 and pH 3.0, the residual activity was about 80 % and 53 %, respectively (Fig. 2c). Most fungal GH10 xylanases have optimal activity in acidic-neutral pH range (4.0–7.0). The exception is the enzyme from *Aspergillus nidulans* KK-99, which performs better in alkaline environment (pH 8.0) (Table 3).

The optimal temperature for xylan enzymatic catalysis was 80 °C (Fig. 2b). Even at 90 °C, a more extreme temperature, the enzyme maintained 73 % of its initial activity. In contrast, the Af-XYLA pre-incubated at these temperatures in the absence of its substrate became completely inactivated after 30 min (Fig. 2d). The main reason might

have been the stabilizing effect caused by the substrate on the enzyme structure (Chang et al., 2017). Similar effects were observed for a GH10 xylanase from *T. flexuosa* (XYN10A) (Anbarasan et al., 2010) and for a GH11 xylanase from *T. lanuginosus* (Xiong et al., 2004), especially under more acidic conditions: both exhibited higher stability in the presence of substrate in a pH-dependent manner. The molecular mechanism behind this protective effect is still unclear, but a possible explanation is the conformational changes caused by substrate binding to the enzyme active site (Anbarasan et al., 2010; Lejeune et al., 2001; Xiong et al., 2004).

After pre-incubation at 50 °C for 24 h, the enzyme lost 40 % of its activity, but remained stable for the next 48 h (Fig. 2e).

The best conditions for Af-XYLA activity were consistent with the best conditions reported for many xylanases, but only a limited number of enzymes showed optimal activity at temperatures as high as 80 °C (Luo et al., 2009; Shibata et al., 2017; van Gool et al., 2013). Only two GH xylanases: Xyn10B from *Myceliophthora thermophila* C1 and XYL10C from *Bispora* sp. MEY-1 have higher optimal temperature (85 °C) than Af-XYLA, as shown in Table 3.

Different spectroscopy methods can be used to characterize the secondary structure of enzymes and their conformational changes under different conditions, providing valuable information about their properties (Ariaeenejad et al., 2019; Kishore et al., 2012). Analysis of the secondary structure by Far-UV CD (Fig. 3a) reinforced that Af-XYLA is a thermostable enzyme that can maintain its local conformations from 25 to 60 °C after heating for 30 min. At 70 °C, the spectrum of the enzyme

changed considerably, indicating that a structural transition occurred. The maximum peak at 190 nm and the minimum peaks at 208 and 222 nm decreased, pointing to α -helix content loss, and the spectrum shifted toward 200 nm, suggesting tendency to denaturation (Banerjee and Sheet, 2017; Crooks et al., 2011; Wallace and Janes, 2009). At 80 and 90 °C, these changes also took place, on a larger scale.

These results corroborated the previous ones: at 30 min, the residual activities were above 60 % from 40 to 60 °C; almost 50 % at 70 °C; and almost depleted at 80 and 90 °C. In fact, from 60 to 90 °C, the α -helix content decreased drastically to 11.9 %, whereas parallel β -strands, turns, and disordered/other structures increased slightly to 5.4 %, 12.8 %, and 43.7 %, respectively; antiparallel β -strands did not change significantly (Supplementary Table 1).

On the basis of the CD results, the melting temperature (T_m) value was 67.7 °C, and two well-defined stages were evident: native (25–60 °C) and denatured (80–90 °C) (Fig. 3b). For comparison, literature values based on CD are T_m of 58.1 °C (20 mM citrate buffer, pH = 5.0) for Xylanase II from *Trichoderma reesei* (López and Estrada, 2014), 45.2 °C (20 mM phosphate buffer, pH = 6.0 in the presence of 2.5 M urea) for BCX from *Bacillus circulans* (Shah et al., 2017), and 57.4 °C (20 mM phosphate buffer, pH = 6.5) for XynA from *Bacillus subtilis* (Alponti et al., 2016).

The elevated T_m value of Af-XYLA was expected because the three disulfide bonds in its structure should make it more resistant to conformational changes. The presence of disulfide bonds, especially at the N or C terminus or in the α -helix regions, is one of the major factors for increased thermal stability (Fan et al., 2020; Kumar et al., 2018; Li et al., 2019a; Takita et al., 2019).

The presence of 12 tryptophan residues made Af-XYLA more sensitive to Intrinsic Tryptophan Fluorescence Emission (ITFE) analysis (Fig. 3c). As in the case of CD, heating the enzyme from 25 to 60 °C did not elicit significant changes, showing that the polarity of the tryptophan residues did not change, either. On the other hand, from 60 to 70 °C, a red shift was evident, indicating transition and more exposure of the tryptophan residues to the polar solvent, which triggered a relaxation of the excitation, as evidenced by decreasing energy of the fluorescence emission—the maximum wavelength (λ_{max}) shifted from 336.4 to 342.2 nm (Supplementary Table 2) (Ghisaidoobe and Chung, 2014; Jayme et al., 2018; Lakowicz, 2013; Sindrewicz et al., 2019). At 80 and 90 °C, there were no marked shifts, but the intensities decreased due to higher exposure.

On the basis of the ITFE data, we determined T_m (Fig. 3d) as 61.9 °C, whilst Xylanase II has T_m of 56.3 °C (López and Estrada, 2014), AuXyn11A from *Aspergillus usami* has T_m of 57.6 °C (20 mM phosphate buffer, pH = 6.5) (Zhang et al., 2014), and AoXyn11A from *Aspergillus oryzae* has T_m of 52.3 °C (50 mM phosphate/citric acid buffer, pH = 5.5) (Li et al., 2017). These values reinforced that Af-XYLA has great thermostability due to its superior T_m , which is supposed to be above 60 °C as indicated by the CD and ITFE techniques.

Given that enzymes need to be exposed to extreme conditions during several industrial processes, one of the most desired properties is enzymatic stability to high temperatures and pH values (Liu et al., 2015; Pellegrini et al., 2015; Wang et al., 2019). Performing biomass saccharification at elevated temperatures is advantageous in many ways; e.g., it reduces polysaccharide viscosity and bacterial contamination risks (Moroz et al., 2015) and enables the enzyme to be directly used after steam pre-treatment, which saves time and energy and reduces the amount of enzyme required during the process (Kamaouri et al., 2014b; Shibata et al., 2017).

3.4. Effect of additives and reaction products on Af-XYLA activity

During industrial processes, GH10 xylanases can be affected by metal ions and other chemicals that may be present as additives in reaction mixtures and which can cause equipment corrosion (Li et al., 2019a; Pereira et al., 2017). Therefore, elucidating which ions or chemicals are

Table 4
Effect of different additives on Af-XYLA activity.

Additive	Relative Activity (%)	Additive	Relative Activity (%)
None	100.0 ± 0.8	MgSO ₄	100.3 ± 0.3
SDS	44.4 ± 2.9	AgNO ₃	0
Tween20	128.4 ± 4.2	CoCl ₂	92.4 ± 2.0
EDTA	92.5 ± 1.3	MnCl ₂	100.7 ± 3.0
β -mercaptoethanol	132.5 ± 1.3	(NH ₄) ₂ SO ₄	94.6 ± 0.2
DMSO	104.7 ± 3.8	CaCl ₂	96.4 ± 0.4
Ascorbic acid	93.0 ± 0.7	KCl	106.1 ± 1.8
CuSO ₄	50.7 ± 1.1	DTT	144.5 ± 3.5
FeSO ₄	53.4 ± 1.7	Triton X-100	111.2 ± 0.2
ZnSO ₄	64.8 ± 0.9	SLS	108.2 ± 1.2

inert or influence Af-XYLA activity positively/negatively is important (Table 4).

EDTA, a chelating agent, does not affect Af-XYLA activity (92.5 %), so it has been suggested that this enzyme is not a metalloprotein (Benhmad et al., 2016). Both β -mercaptoethanol and DTT reducing agents stimulate Af-XYLA activity (132.5 % and 144.5 %, respectively), indicating that the sulfhydryl groups of free cysteine residues (i.e., not involved in disulfide bonds) are positive for enzymatic activity (Karnchanatat et al., 2008).

The surfactants tested herein had distinct effects on Af-XYLA activity. When we exposed the enzyme to SDS, an anionic surfactant, the enzymatic activity decreased to 44.4 %, as expected, because SDS is a well-known strong protein denaturant (Zhou et al., 2011). In contrast, Af-XYLA exposure to SLS and non-anionic surfactants (Triton X-100 and Tween 20), gave relative activities of 108.2 %, 111.2 %, and 128.4 %, respectively. Tolerance to these reagents is an industrially relevant feature because many surfactants are applied in biomass saccharification processes to avoid non-productive adsorption of enzymes onto lignin during hydrolysis (Li et al., 2016; Rocha-Martín et al., 2017).

The addition of K⁺, NH₄⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, or Mg²⁺ did not affect Af-XYLA activity, but the addition of Cu²⁺, Zn²⁺, or Fe²⁺ reduced enzymatic activity to 50.7 %, 64.8 %, and 53.4 %, respectively. Cupric ions are known for strongly inhibiting xylanases because they catalyze the auto-oxidation of cysteines in disulfide bonds, to form sulfenic acid (Chen et al., 2019b; Maitan-Alfenas et al., 2016). Similarly, Fe²⁺ ions have been reported to affect other xylanases from *Aspergillus* sp. negatively because they oxidize the indole ring and interact with the amino acid residues present in the catalytic site of the enzymes (Chen et al., 2019b).

Bivalent cations such as Ca²⁺ and Mg²⁺ can act as activators by helping to stabilize the enzyme-substrate complex of some GH10 xylanases (Haq and Akram, 2019; Li et al., 2019a; Liew et al., 2019). For example, 2 mM Ca²⁺ or 5 mM Mg²⁺ enhances the activity of XynBCA from *Caldicoprobacter algeriensis* (relative activity > 120 %) (Mhiri et al., 2020). Likewise, Ca²⁺ improves both the stability and activity (~450 %) of Xyn10A from *Thermotoga thermarum* (Shi et al., 2013) and the activity of TnXynB from *Thermotoga naphthophila* RKU-10 (136 %) (Haq and Akram, 2019). However, these ions did not affect Af-XYLA.

Finally, AgNO₃ completely inhibited the enzyme. The theoretical reason for heavy metals, such as Ag and Hg, inhibiting the enzyme is their strong affinity for reduced sulfhydryl and other reactive groups like CONH₂, NH₂, COOH, and PO₄ (Liew et al., 2019; Meleiro et al., 2018; Narra et al., 2014).

As lignocellulose hydrolysis proceeds, it releases increasing amounts of compounds originating from lignocellulose degradation. These compounds accumulate in the reaction medium, which can affect the catalytic efficiency of xylanases and other CAZymes (Chen et al., 2019a). Particularly, products generated from the activities of xylanases and cellulases (e.g., xylose, xylitol, glucose, and cellobiose) and sugar fermentation (ethanol) can inhibit the action of hydrolases, preventing high final yields to be achieved at low cost (Chen et al., 2019a; Maulana Hidayatullah et al., 2020; Meleiro et al., 2018; Zou et al., 2021). Thus,

Fig. 4. (a) Monosaccharide and (b) ethanol effects on Af-XYLA activity.

Table 5

Af-XYLA relative activities on Beechwood xylan, Tamarind xyloglucan, Low viscosity CM-Cellulose, and Avicel® PH-101.

Substrate	Relative activity (%)
Beechwood xylan	100.0 ± 0.4
Tamarind xyloglucan	3.1 ± 0.06
Low viscosity CM-Cellulose	ND
Avicel® PH-101	ND

ND: Not detectable.

tolerance to inhibition by these hydrolysis-fermentation products is essential for efficient and economical application of enzymes in industrial biomass-converting processes (Meleiro et al., 2018). In this sense, investigating the effects of the end-products D-xylose, D-glucose, and ethanol on Af-XYLA activity during xylan degradation is crucial in our quest to elucidate the properties of this enzyme.

We added increasing concentrations of the aforementioned monosaccharides (10–250 mM) and ethanol (0.5–50 % (v/v)) individually to the reactions, and we measured the relative Af-XYLA activity as compared to the control system (Fig. 4).

Xylose and glucose at 10 mM inhibited xylanase activity by approximately 10 %. Regardless of this slight decline, higher sugar concentrations did not elicit any loss, and the enzyme remained surprisingly stable up to 250 mM.

Ethanol decreased Af-XYLA activity more markedly. At 1%, ethanol did not exert any effect; in the presence of 10 % ethanol, the enzyme retained 73 % of its maximum activity. However, the enzymatic activity dropped to 34 and 7% in the presence of 25 and 50 % ethanol, respectively. Hack & Akram (2019) reported a more ethanol-resistant GH10 xylanase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10A (TnXynB), which displayed >45 % of activity at 50 % ethanol (v/v) (Haq and Akram, 2019). On the other hand, Af-XYLA was more tolerant to ethanol than Xyn11–1 (Wang et al., 2017) and XynAHJ3 (Zhou et al., 2012), which presented relative activities of 59.8 % and 44.2 %, respectively, in the presence of 10 % ethanol.

3.5. Substrate specificity and kinetic parameters

When we evaluated Af-XYLA specificity for other substrates besides xylan, we did not detect any activity (Table 5). In fact, most GH10 xylanases are enzymes without reported cellulase activity (Wang et al., 2019).

Nevertheless, the enzyme was substantially active toward beechwood xylan, as evidenced by the kinetic parameters (Table 3). At 50 °C, a temperature that is commonly used in biorefineries during biomass saccharification by enzyme cocktails (Mohd Azhar et al., 2017), the V_{max} and K_M values were $35,756 \pm 1279$ U mg⁻¹ and 1.62 ± 0.19 mg mL⁻¹,

respectively. When we conducted the reaction at the optimal temperature condition (80 °C), V_{max} was even better, $88,082 \pm 2639$ U mg⁻¹, and K_M was 4.09 ± 0.39 mg mL⁻¹. Only one fungal GH10 xylanase has kinetic constants of the same order of magnitude as Af-XYLA: XYL10C from *Bispora* sp. MEY-1. Even so, its V_{max} values ($23,728$ U mg⁻¹ for oat spelt xylan and $18,744$ U mg⁻¹ for birchwood xylan) were far from those obtained for the recombinant enzyme from *A. fumigatus*.

The low K_M values of Af-XYLA meant that small amounts of substrate were required to saturate the enzyme. On the other hand, the high values for the k_{cat}/K_M ratio highlighted its remarkable catalytic efficiency in converting xylan (Uday et al., 2017).

Stability to operational conditions and catalytic performance are the most important characteristics to consider when selecting an enzyme for industrial purposes (Uday et al., 2017). Together, our results leave no doubt about the Af-XYLA potential for such applications. However, to overcome the barrier imposed by the recalcitrant structure of biomass and to achieve complete biomass degradation, enzymes need to be able to act synergistically with each other (Bernardi et al., 2021; Song et al., 2016).

3.6. Optimization of saccharification parameters for increased sugar yields

Enzymatic hydrolysis is a key step in lignocellulose processing to obtain bioproducts and bioenergy. Enzyme performance depends on several operational factors, including enzyme load, pH, temperature, reaction time, and substrate and surfactant concentrations. Many researchers aiming at improved reaction rates and yields have successfully applied statistical optimizations (Ben Taher et al., 2017; Das et al., 2015; Ferreira et al., 2009; Pandiyan et al., 2014; Sayed Jamaludin et al., 2013; Van Dyk and Pletschke, 2012).

Application of xylanases during saccharification of pre-treated biomass improves sugar yields: these enzymes solubilize xylan, thus increasing the accessibility of cellulases to cellulose and the overall efficiency of the process (Chen et al., 2019a; Ferreira et al., 2009; Uday et al., 2017). Furthermore, we have previously reported that Tween 20 positively affects Af-XYLA activity. In fact, the addition of surfactants benefits biomass saccharification and has thus been a target factor in DoE optimization studies (Ben Taher et al., 2017; Das et al., 2015; Ferreira et al., 2009; Noratiqah et al., 2013).

We used a CCRD 2³ statistical approach to investigate how Af-XYLA behaves during hydrolysis of pre-treated SEB or SDB and to determine the optimal concentration of this enzyme (μg/g substrate) and the optimal values of the parameters Celluclast® 1.5 L load (FPU/g substrate) and Tween 20 (% (v/v)) for maximum release of reducing sugars.

The design matrixes consisted of 19 experiments, with eight factorial points, six axial points, and five repetitions at the central point (0) (Table 6).

Table 6

CCR Design matrix and experimental values for optimization of SEB and SDB hydrolyses.

Run	A- Tween 20 (% v/v)	B-Celluclast® 1.5 L (FPU/g)	C- Af- XYLA (µg/g)	Reducing sugars (%)	
				SEB hydrolysis	SDB hydrolysis
1	-1	-1	-1	2.99	19.42
2	1	-1	-1	4.36	21.78
3	-1	1	-1	4.43	32.87
4	1	1	-1	5.79	28.61
5	-1	-1	1	3.21	23.34
6	1	-1	1	4.66	24.31
7	-1	1	1	5.11	35.36
8	1	1	1	6.49	39.43
9	-1.68	0	0	2.20	26.90
10	1.68	0	0	5.52	27.91
11	0	-1.68	0	3.02	16.67
12	0	1.68	0	5.69	36.29
13	0	0	-1.68	1.56	6.97
14	0	0	1.68	5.74	28.65
15	0	0	0	5.27	29.07
16	0	0	0	5.57	31.75
17	0	0	0	5.75	29.50
18	0	0	0	5.75	28.29
19	0	0	0	5.78	28.49

3.6.1. Sugarcane exploded bagasse (SEB) hydrolysis optimization

The quadratic polynomial that described the relationship between the three independent variables and the yield of reducing sugars (%) from SEB hydrolysis is shown in Eq. 2.

$$Y = 5.554868 + 0.816200 A + 0.811017 B + 0.652783 C - 0.008725 AB + 0.012602 AC + 0.109543 BC - 0.444636 A^2 - 0.268779 B^2 - 0.520199 C^2 \quad (2)$$

A Pareto chart allows the effects of each individual parameter and their interactions to be visualized (Fig. 5). *P* values less than 0.01 suggest model terms are significant, so we can conclude that the linear effects of the three independent variables were positive and significant, indicating that all of them were critical to the success of the hydrolysis reaction.

We attested the statistical significance of the mathematical model by Fisher's *F*-test. ANOVA is given in Table 7. We checked the fit of the model by coefficient of determination ($R^2 > 0.75$ indicates the model is

apt) (Ferreira et al., 2009).

The regression was significant, as evidenced by the *F*-test, which gave a calculated *F* value higher than 5.064 (*F*-critical value), while lack of fit was not significant ($F < 27.345$). These statistical results ensured that the model is adequate to predict the percentage of reducing sugars released under any sets of combination of the variables.

Fig. 6 represents the 3D response surface plots of two independent variables; the remaining variables are fixed at their respective zero levels. The maximal response (6.7 % or 67 mg g⁻¹) was predicted to be reached under the following conditions: 3.75 µg g⁻¹ xylanase, 1.8 FPU g⁻¹ Celluclast®1.5 L, and 0.75 % (v/v) Tween 20. We validated the predictions by conducting SEB hydrolysis under the aforementioned optimal values in a quadruplicate experiment. The actual response was 7.1 % (71 mg g⁻¹), which agreed well with the predicted response.

3.6.2. Sugarcane delignified bagasse (SDB) hydrolysis optimization

The quadratic polynomial that described the relationship between the three independent variables and the yield of reducing sugars (%) from SDB hydrolysis is shown in Eq. 3.

$$Y = 29.19930 + 0.35432 A + 5.89137 B + 4.11533 C - 0.44108 AB + 0.86762 AC + 0.85793 BC + 0.28154 A^2 - 0.04819 B^2 - 3.11881 C^2 \quad (3)$$

Moreover, the Pareto chart in Fig. 7 provides a better view of the effects of the parameters. Both xylanase and cellulase loadings had positive and significant linear effects on the response. In contrast to our previous observation for SEB, addition of Tween did not affect the

Table 7

Analysis of variance (ANOVA) for the fitted second-order model that describes release of reducing sugars from SEB as a function of independent variables.

Source of variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	F-critical (α = 0.01)
Regression	5	28.01391	5.602782	9.9482929	5.064
Residual	12	6.75828	0.5631903		
Lack of fit	9	6.59535	0.732817	13.4931	27.345
Pure error	3	0.16293	0.054310		
Total	17	34.77219			

$R^2 = 0.81$.

Adj $R^2 = 0.72$.

Fig. 5. Pareto chart of Standardized Effects for the yield of reducing sugars (%) from SEB hydrolysis.

Fig. 6. 3D Response surface plots showing the effects of a) Celluclast®1.5 L and Tween 20, b) Af-XYLA and Tween 20, and c) Af-XYLA and Celluclast®1.5 L on the production of reducing sugars from SEB. The remaining variables were fixed at their zero levels.

SDB hydrolysis yields. Tween 20 assists in lignocellulose hydrolysis because it decreases non-productive adsorption of cellulases onto lignin by occupying the hydrophobic regions on the surface of these polymers (Ferreira et al., 2009). Because SDB results from a chemical pretreatment that removes the lignin fraction, Tween 20 was not even expected to have any effect on enzymatic degradation of this biomass. Supplementary Table 3 (de Gouveia et al., 2018; Siqueira et al., 2013) compares the SEB and SDB compositions.

ANOVA is given in Table 8. The regression model proved to be significant and predictive, as indicated by the *F*-test results. Fig. 8 displays the response surface plot of the two significant factors (Af-XYLA and Celluclast®1.5 L loads). Maximal response (40.5 % or 405 mg g⁻¹) could be achieved with 3.75 μg g⁻¹ xylanase and 1.8 FPU g⁻¹ cellulases. Interestingly, we determined the same optimal values for SEB. Finally, we attested the validity of the method by performing the SDB hydrolysis with these optimal values of enzyme load, to find a reducing sugar percentage of 37.5 % (375 mg g⁻¹), which agreed well with the predicted response.

3.7. Effect of the synergistic action of enzymes on the saccharification of pre-treated sugarcane bagasses

The combined activities of cellulases and xylanases can improve the saccharification of various xylan-containing biomasses more effectively than increasing cellulase load (Chen et al., 2019a; Song et al., 2016). Therefore, we evaluated how the synergistic action between Af-XYLA and Celluclast® 1.5 L affected SEB and SDB depolymerization. We carried out the reactions at 50 °C and pH 6.0 for up to 48 h, and we used the optimal concentrations statistically estimated for the recombinant xylanase (3.75 μg g⁻¹) and Celluclast® 1.5 L (1.8 FPU g⁻¹). We also added 0.75 % Tween 20 (v/v) as additive in SEB hydrolysis.

Fig. 9 shows that the presence of Af-XYLA in the reactions enhanced the release of reducing sugars from both substrates in a time-dependent manner, demonstrating the high degree of synergy between the enzymes. For SEB, hydrolysis improved by about 155 % after 24 and 48 h (Fig. 9a). For SDB, saccharification was xylanase-boosted by 305 % and 277 % after 24 and 48 h, respectively (Fig. 9b). These data also

Fig. 7. Pareto chart of Standardized Effects for yields of reducing sugars yields (%) from SDB hydrolysis.

Table 8

Analysis of variance (ANOVA) for the fitted second-order model that describes the release of reducing sugars from SDB as a function of independent variables.

Source of variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	F-critical ($\alpha = 0.01$)
Regression	3	848.82265	282.94088	29.09564	5.292
Residual	16	155.59218	9.7245115		
Lack of fit	11	147.769	13.4336	8.5859	9.963
Pure error	5	7.823	1.5646		
Total	19	1004.415			

$R^2 = 0.85$.

Adj $R^2 = 0.82$.

reinforced the limits imposed by lignin on the recovery of sugars from biomass, evidenced by the magnitude of the difference between the scales of the graphs (Bernal-Lugo et al., 2019; Tian et al., 2017).

Numerous research works have focused on synergy studies involving xylanases and cellulases. Hu et al. (2011) reported that addition of Multifect xylanase increased the yield and extent of hydrolysis of steam-pretreated corn stover by Celluclast® 1.5 L from 45 % to 87 % (Hu et al., 2011). Similarly, hydrolysis of pre-treated corn stover performed by cooperative action of XynA (a xylanase from *Bacillus* sp.) and Celluclast® 1.5 L resulted in higher production of reducing sugars when compared to the cocktail alone: increases of 48.7 % and 77.6 % were respectively obtained with 2 and 4 U_{BirWX} of XynA (Wang et al., 2019). Both xylanases MYCTH_56237 and MYCTH_49824 from *Myceliophthora thermophila* also cooperated synergistically with Celluclast® 1.5 L,

Fig. 8. 3D response surface plot showing the effects of Celluclast® 1.5 L and Af-XYLA on the production of reducing sugars from SDB. Tween 20 was fixed at its zero level.

Fig. 9. Effect of synergistic action between *Af*-XYLA and Celluclast®1.5 L on the hydrolysis of a) SEB and b) SDB. All the reactions were incubated in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% (w/v) substrate at 1000 rpm and 50 °C for 24 or 48 h. The data represent the mean $\pm$ standard error obtained from at least three experimental replicates.

increasing hydrolysis of pretreated corn stover from 30 % to 50.3 and 55.6 %, respectively (Basit et al., 2018). Likewise, Song et al. (2016) observed that xylanase-cellulase co-treatment improved corncob powder, corn stover, and rice straw hydrolysis by 133 %, 164 %, and 545 %, respectively (Song et al., 2016). Together, these results evidenced the potential of applying synergistic strategies to improve the content of sugars released from biomass saccharification.

4. Conclusions

Stability to additives and operational conditions, high catalytic efficiency, and elevated degree of synergism with other CAZymes are major requirements that make a biocatalyst suitable for most industrial processes, and *Af*-XYLA met all of them. The recombinant xylanase from *A. fumigatus* displayed the best performance at 80 °C and withstood long pre-incubation at 50 °C well. Furthermore, it exhibited great activities over a wide pH range: its optimal activity was achieved at pH 5–7, but it

worked with 80 % of its maximum potential at pH 4 and 8. Besides, to the best of our knowledge, *Af*-XYLA presented the best kinetic parameters among fungal GH10 xylanases. Finally, its cooperative action with Celluclast®1.5 L successfully boosted biomass saccharification rates. Together, the remarkable properties of *Af*-XYLA highlight it as a promising candidate for several biotechnological applications, from depolymerization of the plant cell wall, to obtain fermentation products, to pulp pre-bleaching in the paper industry.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

Data sharing is not applicable to this article.

Funding

This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2016/190950-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 425465/2016-0). AVB and LEG were funded by a scholarship granted by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), Finance Code 001.

Authors' contributions

Conceptualization: A.V.B., L.E.G. and T.M.D.; data curation: A.V.B. and L.E.G., formal analysis: A.V.B. and L.E.G.; methodology: A.V.B.; supervision: S.A.U. and T.M.D.; writing (original draft): A.V.B. and T.M.D.; writing (review and editing): A.V.B. and T.M.D.; project administration: S.A.U. and T.M.D.; funding acquisition: T.M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

CRediT authorship contribution statement

Aline Vianna Bernardi: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Luis Eduardo Gerolamo:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis. **Sergio Akira Uyemura:** Supervision, Project administration. **Taisa Magnani Dinamarco:** Conceptualization, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113697>.

References

- Alponti, J.S., Fonseca Maldonado, R., Ward, R.J., 2016. Thermostabilization of *Bacillus subtilis* GH11 xylanase by surface charge engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 87, 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.003>.
- Anbarasan, S., Jänis, J., Paloheimo, M., Laitaoja, M., Vuolanto, M., Karimäki, J., Vainiotalo, P., Leisola, M., Turunen, O., 2010. Effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase produced by *thermopolyspora flexuosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 356–360. <https://doi.org/10.1128/AEM.00357-09>.
- Ariaenejad, S., Hosseini, E., Maleki, M., Kavousi, K., Moosavi-Movahedi, A.A., Salekdeh, G.H., 2019. Identification and characterization of a novel thermostable xylanase from camel rumen metagenome. *Int. J. Biol. Macromol.* 126, 1295–1302. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.041>.
- Banerjee, R., Sheet, T., 2017. Ratio of ellipticities between 192 and 208 nm (R1): an effective electronic circular dichroism parameter for characterization of the helical components of proteins and peptides. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 85, 1975–1982. <https://doi.org/10.1002/prot.25351>.
- Basit, A., Liu, J., Miao, T., Zheng, F., Rahim, K., Lou, H., Jiang, W., 2018. Characterization of two endo- β -1, 4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. *Front. Microbiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00233>.
- Ben Taher, I., Fickers, P., Chniti, S., Hassouna, M., 2017. Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues. *Biotechnol. Prog.* 33, 397–406. <https://doi.org/10.1002/btpr.2427>.
- Benhad, I., Boudabbous, M., Yaich, A., Rebai, M., Gargouri, A., 2016. A novel neutral, halophile *Stachybotrys microspora*-based endoglucanase active impact on β -glucan. *Bioprocess Biosyst. Eng.* <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1549-1>.
- Bernal-Lugo, I., Jacinto-Hernandez, C., Gimeno, M., Carmina Montiel, C., Rivero-Cruz, F., Velasco, O., 2019. Highly efficient single-step pretreatment to remove lignin and hemicellulose from softwood. *BioResources* 14, 3567–3577. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.3567-3577>.
- Bernardi, A.V., Gouvêa, P.F., De, Gerolamo, L.E., Yonamine, D.K., Lourdes, L., De, Balico, D.L., Uyemura, S.A., 2018. Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application. *Protein Expr. Purif.* 150, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.04.016>.
- Bernardi, A.V., Yonamine, D.K., Uyemura, S.A., Dinamarco, T.M., 2019. A Thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 Endoglucanase Over-expressed in *Pichia pastoris* Stimulates Lignocellulosic Biomass Hydrolysis.
- Bernardi, A.V., Gerolamo, L.E., Fagundes, P., Gouv, D., Yonamine, D.K., Matheus, L., Pereira, S., Henrique, A., Oliveira, C., De, Uyemura, A., Dinamarco, T.M., 2021. LPMO Af AA9_B and Cellobiohydrolase Af Cel6A From A. *Fumigatus* Boost Enzymatic Saccharification Activity of Cellulase Cocktail.
- Carli, S., Meleiro, L.P., Rosa, J.C., Moraes, L.A.B., Jorge, J.A., Masui, D.C., Furriel, R.P., M., 2016. A novel thermostable and halotolerant xylanase from *Colletotrichum graminicola*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133, S508–S517. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.05.002>.
- Chadha, B.S., Kaur, B., Basotra, N., Tsang, A., Pandey, A., 2019. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: current perspective. *Bioresour. Technol.* 277, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.044>.
- Chang, X., Xu, B., Bai, Y., Luo, H., Ma, R., Shi, P., Yao, B., 2017. Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171111>.
- Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P., Eurwilaichitr, L., 2006. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 46, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.013>.
- Chen, L.L., Zhang, M., Zhang, D.H., Chen, X.L., Sun, C.Y., Zhou, B.C., Zhang, Y.Z., 2009. Purification and enzymatic characterization of two β -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. *Bioresour. Technol.* 100, 5230–5236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.038>.
- Chen, X., Xin, D., Wang, R., Qin, Y., Wen, P., Hou, X., Zhang, J., 2019a. Factors affecting hydrolytic action of xylanase during pennisetum saccharification: role of cellulose and its derivatives. *Ind. Crops Prod.* 130, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.077>.
- Chen, Z., Zaky, A.A., Liu, Y., Chen, Y., Liu, L., Li, S., Jia, Y., 2019b. Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corn cobs. *Protein Expr. Purif.* 154, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.10.006>.
- Couturier, M., Feliu, J., Haon, M., Navarro, D., Lesage-Meessen, L., Coutinho, P.M., Berrin, J.G., 2011. A thermostable GH45 endoglucanase from yeast: impact of its atypical multimodularity on activity. *Microb. Cell Fact.* 10 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-103>.
- Crooks, R.O., Rao, T., Mason, J.M., 2011. Truncation, randomization, and selection: generation of a reduced length c-jun antagonist that retains high interaction stability. *J. Biol. Chem.* 286, 29470–29479. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.221267>.
- Das, S., Bhattacharya, A., Haldar, S., Ganguly, A., Gu, S., Ting, Y.P., Chatterjee, P.K., 2015. Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: comparison between artificial neural network and response surface methodology. *Sustain. Mater. Technol.* 3, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2015.01.001>.
- de Amo, G.S., Bezerra-Bussoli, C., da Silva, R.R., Kishi, L.T., Ferreira, H., Mariutti, R.B., Arni, R.K., Gomes, E., Bonilla-Rodriguez, G.O., 2019. Heterologous expression, purification and biochemical characterization of a new xylanase from *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. *Int. J. Biol. Macromol.* 131, 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.108>.
- de Gouvêa, P.F., Bernardi, A.V., Gerolamo, L.E., de Souza Santos, E., Riaño-Pachón, D.M., Uyemura, S.A., Dinamarco, T.M., 2018. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. *BMC Genomics* 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4627-8>.
- Decelle, B., Tsang, A., Storms, R.K., 2004. Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4- β -xylanases. *Curr. Genet.* 46, 166–175. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0520-x>.
- Du, Y., Shi, P., Huang, H., Zhang, X., Luo, H., Wang, Y., Yao, B., 2013. Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Humicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. *Bioresour. Technol.* 130, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.067>.
- Evangelista, D.E., Kadowaki, M.A.S., Mello, B.L., Polikarpov, I., 2018. Biochemical and biophysical characterization of novel GH10 xylanase prospected from a sugar cane bagasse compost-derived microbial consortia. *Int. J. Biol. Macromol.* 109, 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.099>.
- Fan, G., Wu, Q., Li, Q., Sun, B., Ma, Y., Wu, K., Wang, C., Teng, C., Yang, R., Li, X., 2020. Impact of the disulfide bond on hydrolytic characteristics of a xylanase from *Talaromyces thermophilus* F1208. *Int. J. Biol. Macromol.* 164, 1748–1757. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.270>.

- Ferreira, S., Duarte, A.P., Ribeiro, M.H.L., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2009. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochem. Eng. J.* 45, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.03.012>.
- Ghatora, S.K., Chadha, B.S., Badhan, A.K., Saini, H.S., Bhat, M.K., 2006. Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. *BioResources* 1, 18–33. <https://doi.org/10.15376/biores.1.1.18-33>.
- Ghisaidoobe, A.B.T., Chung, S.J., 2014. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22518–22538. <https://doi.org/10.3390/ijms15122518>.
- Gouvêa, P.F., Gerolamo, L.E., Bernardi, A.V., Matheus, L., Pereira, S., Uyemura, S.A., Dinamarco, T.M., 2019. Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* Can Improve Enzymatic Cocktail Activity during Sugarcane Bagasse Hydrolysis, pp. 1–9. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190228163629>.
- Greenberg, D.M., 1929. The colorimetric determination of the serum proteins. *J. Biol. Chem.* 82, 545–550. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)78300-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)78300-6).
- Guillén, D., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R., 2010. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1241–1249. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2331-y>.
- Han, N., Ma, Y., Mu, Y., Tang, X., Li, J., Huang, Z., 2019. Enhancing thermal tolerance of a fungal GH11 xylanase guided by B-factor analysis and multiple sequence alignment. *Enzyme Microb. Technol.* 131 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109422>.
- Haq, Iul, Akram, F., 2019. Insight into kinetics and thermodynamics of a novel hyperstable GH family 10 endo-1,4- β -xylanase (TnXynB) with broad substrates specificity cloned from *Thermotoga naphthophila* RKU-10T. *Enzyme Microb. Technol.* 127, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.04.009>.
- He, J., Tang, F., Chen, D., Yu, B., Luo, Y., Zheng, P., Mao, X., Yu, J., Yu, F., 2019. Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from *Trichoderma reesei*. *PLoS One* 14, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210548>.
- Hoffman, Z.B., Zanphorlin, L.M., Cota, J., Diogo, J.A., Almeida, G.B., Damásio, A.R.L., Squina, F., Murakami, M.T., Ruller, R., 2016. Xylan-specific carbohydrate-binding module belonging to family 6 enhances the catalytic performance of a GH11 endo-xylanase. *N. Biotechnol.* 33, 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.02.006>.
- Hu, J., Saddler, J.N., 2018. Why does GH10 xylanase have better performance than GH11 xylanase for the deconstruction of pretreated biomass? *Biomass Bioenergy* 110, 13–16. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.01.007>.
- Hu, J., Arantes, V., Saddler, J.N., 2011. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol. Biofuels* 4. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-36>.
- Inoue, H., Kishishita, S., Kumagai, A., Kataoka, M., Fujii, T., Ishikawa, K., 2015. Contribution of a family 1 carbohydrate-binding module in thermostable glycoside hydrolase 10 xylanase from *Talaromyces cellulolyticus* toward synergistic enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels* 8, 3–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0259-2>.
- Jayme, C.C., Calori, I.R., Cunha, E.M.F., Tedesco, A.C., 2018. Evaluation of aluminum phthalocyanine chloride and DNA interactions for the design of an advanced drug delivery system in photodynamic therapy. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 201, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.009>.
- Joshi, N., Sharma, M., Singh, S.P., 2020. Characterization of a novel xylanase from an extreme temperature hot spring metagenome for xylooligosaccharide production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 4889–4901. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10562-7>.
- Kabsch, W., Sander, C., 1983. How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS Lett.* 155, 179–182.
- Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I., Christakopoulos, P., 2014a. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. *Front. Microbiol.* 5, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00281>.
- Karnaouri, A.C., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2014b. Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4895-9>.
- Karnchanat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piapukiew, J., Whalley, A.J.S., Reynolds, C.D., Gadd, G.M., Sihanonth, P., 2008. A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.009>.
- Kim, H.M., Lee, K.H., Kim, K.H., Lee, D.S., Nguyen, Q.A., Bae, H.J., 2014. Efficient function and characterization of GH10 xylanase (Xyl10g) from *Gloeophyllum trabeum* in lignocellulose degradation. *J. Biotechnol.* 172, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.12.013>.
- Kishore, D., Kundu, S., Kayastha, A.M., 2012. Thermal, chemical and pH induced denaturation of a multimeric β -Galactosidase reveals multiple unfolding pathways. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050380>.
- Kumar, V., Marín-Navarro, J., Shukla, P., 2016. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-2005-0>.
- Kumar, V., Dangi, A.K., Shukla, P., 2018. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. *Mol. Biotechnol.* 60, 226–235. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0059-6>.
- Lafond, M., Tauzin, A., Desseaux, V., Bonnin, E., Ajandouz, E.H., Giardina, T., 2011. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. *Microb. Cell Fact.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-20>.
- Lakbub, J.C., Shipman, J.T., Desaire, H., 2018. Recent mass spectrometry-based techniques and considerations for disulfide bond characterization in proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 2467–2484. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0772-1>.
- Lakowicz, J.R., 2013. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science & Business Media.
- Lejeune, A., Vanhove, M., Lamotte-Brasseur, J., Pain, R.H., Frère, J.M., Matagne, A., 2001. Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 α -lactamase. *Chem. Biol.* 8, 831–842. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00053-9).
- Li, Z., Sun, Z., Ge, X., Zhang, J., 2016. Effects of lignin and surfactant on adsorption and hydrolysis of cellulases on cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 9, 0–9. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0434-0>.
- Li, X.Q., Wu, Q., Hu, D., Wang, R., Liu, Y., Wu, M.C., Li, J.F., 2017. Improving the temperature characteristics and catalytic efficiency of a mesophilic xylanase from *Aspergillus oryzae*, AoXyn11A, by iterative mutagenesis based on in silico design. *AMB Express* 7. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0399-9>.
- Li, G., Chen, X., Zhou, X., Huang, R., Li, L., Miao, Y., Liu, D., Zhang, R., 2019a. Improvement of GH10 family xylanase thermostability by introducing of an extra α -helix at the C-terminal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 515, 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.163>.
- Li, Z., Li, X., Liu, T., Chen, S., Liu, H., Wang, H., Li, K., Song, Y., Luo, X., Zhao, J., Zhang, T., 2019b. The critical roles of exposed surface residues for the thermostability and halotolerance of a novel GH11 xylanase from the metagenomic library of a saline-alkaline soil. *Int. J. Biol. Macromol.* 133, 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.090>.
- Liew, K.J., Ngooi, C.Y., Shamsir, M.S., Sani, R.K., Chong, C.S., Goh, K.M., 2019. Heterologous expression, purification and biochemical characterization of a new endo-1,4- β -xylanase from *Rhodothermaceae bacterium* RA. *Protein Expr. Purif.* 164, 105464. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105464>.
- Liu, Y., Dun, B., Shi, P., Ma, R., Luo, H., Bai, Y., Xie, X., Yao, B., 2015. A novel GH7 Endo- β -1,4-glucanase from *Neosartorya fischeri* P1 with good thermostability, broad substrate specificity and potential application in the brewing industry. *PLoS One* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137485>.
- Liu, Y., Sun, Y., Wang, H., Tang, L., 2019. Characterization of a novel multi-domain xylanase from *Clostridium clariflavum* with application in hydrolysis of corn cobs. *Biotechnol. Lett.* 41, 1177–1186. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02721-2>.
- López, G., Estrada, P., 2014. Effect of Temperature on Xylanase II from *Trichoderma reesei* QM 9414: a calorimetric, catalytic, and conformational study. *Enzyme Res.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/708676>.
- Luo, H., Li, J., Yang, J., Wang, H., Yang, Y., Huang, H., Shi, P., Yuan, T., Fan, Y., Yao, B., 2009. A thermophilic and acid stable family-10 xylanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Extremophiles* 13, 849–857. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0272-0>.
- Maitan-Alfenas, G.P., Oliveira, M.B., Nagem, R.A.P., de Vries, R.P., Guimarães, V.M., 2016. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.065>.
- Malgas, S., Pletschke, B.I., 2019. The effect of an oligosaccharide reducing-end xylanase, BhRex8A, on the synergistic degradation of xylan backbones by an optimised xylanolytic enzyme cocktail. *Enzyme Microb. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.12.010>.
- Mathibe, B.N., Malgas, S., Radosavljevic, L., Kumar, V., Shukla, P., Pletschke, B.I., 2020. Tryptic mapping based structural insights of endo-1, 4- β -Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* VAPS-24. *Indian J. Microbiol.* 60, 392–395. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00879-2>.
- Maulana Hidayatullah, I., Setiadi, T., Tri Ari Penia Kresnowati, M., Boopathy, R., 2020. Xylanase inhibition by the derivatives of lignocellulosic material. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122740>.
- Meleiro, L.P., Carli, S., Fonseca-Maldonado, R., da Silva Torricillas, M., Zimbardi, A.L.R., Ward, R.J., Jorge, J.A., Furriel, R.P.M., 2018. Overexpression of a cellobiose-glucose-Halotolerant endoglucanase from *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 185, 316–333. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2660-8>.
- Mhiri, S., Bouanane-Darenfed, A., Jemli, S., Neifar, S., Ameri, R., Mezghani, M., Bouacem, K., Jaouadi, B., Bejar, S., 2020. A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.162>.
- Miao, Y., Kong, Y., Li, P., Li, G., Liu, D., Shen, Q., Zhang, R., 2018. Effect of CBM1 and linker region on enzymatic properties of a novel thermostable dimeric GH10 xylanase (Xyn10A) from filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* Z5. *AMB Express* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0576-5>.
- Miesonai, A., Wien, F., Buljaki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., Kardos, J., 2018. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* 46, W315–W322. <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

- Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Mohd Faik, A.A., Rodrigues, K.F., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. *Biochem. Biophys. Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>.
- Monclaro, A.V., Recalde, G.L., da Silva, F.G., de Freitas, S.M., Ferreira Filho, E.X., 2019. Xylanase from *Aspergillus tamarii* shows different kinetic parameters and substrate specificity in the presence of ferulic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 120, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.09.009>.
- Moroz, O.V., Maranta, M., Shaghahi, T., Harris, P.V., Wilson, K.S., Davies, G.J., 2015. The three-dimensional structure of the cellobiohydrolase Cel7A from *Aspergillus fumigatus* at 1.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 71, 114–120. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14027307>.
- Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Kumar, K., Madamwar, D., Shah, A.R., 2014. Production, purification and characterization of a novel GH12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 88, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.016>.
- Natesh, R., Bhanumoorthy, P., Vithayathil, P.J., Sekar, K., Ramakumar, S., Viswanatha, M.A., 1999. Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *J. Mol. Biol.* 288, 999–1012. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2727>.
- Noratiqah, K., Madihah, M.S., Aisyah, B.S., Eva, M.S., Suraini, A.A., Kamarulzaman, K., 2013. Statistical optimization of enzymatic degradation process for oil palm empty fruit bunch (OPEFB) in rotary drum bioreactor using crude cellulase produced from *Aspergillus niger* EFB1. *Biochem. Eng. J.* 75, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.007>.
- Oliveira, D.S., Meher-Dini, C., Franco, C.M.L., Gomes, E., Da-Silva, R., 2010. Production of crude xylanase from *Thermoascus Aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. *J. Food Sci.* 75, 588–594. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01740.x>.
- Pandiyar, K., Tiwari, R., Singh, S., Nain, P.K.S., Rana, S., Arora, A., Singh, S.B., Nain, L., 2014. Optimization of enzymatic saccharification of alkali pretreated *Parthenium* sp. using response surface methodology. *Enzyme Res.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/764898>.
- Pasin, T.M., Salgado, J.C.S., Scarella, A.Sde A., de Oliveira, T.B., de Lucas, R.C., Cereia, M., Rosa, J.C., Ward, R.J., Buckridge, M.S., Polizeli, Mde L.Tde M., 2020. A halotolerant Endo-1,4-β-Xylanase from *Aspergillus clavatus* with potential application for agroindustrial residues saccharification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 191, 1111–1126. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03232-x>.
- Pell, G., Szabo, L., Charnock, S.J., Xie, H., Gloster, T.M., Davies, G.J., Gilbert, H.J., 2004. Structural and biochemical analysis of *Celvibrio japonicus* Xylanase 10C: how variation in substrate-binding cleft influences the catalytic profile of family GH-10 xylanases. *J. Biol. Chem.* 279, 11777–11788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311947200>.
- Pellegrini, V.O.A., Serpa, V.L., Godoy, A.S., Camilo, C.M., Bernardes, A., Rezende, C.A., Junior, N.P., Franco Cairo, J.P.L., Squina, F.M., Polikarpov, I., 2015. Recombinant *Trichoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9591–9604. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6772-1>.
- Pereira, Jde C., Giese, E.C., Moretti, M.Mde S., Gomes, A.Cdos S., Perrone, O.M., Boscolo, M., da Silva, R., Gomes, E., Martins, D.A.B., 2017. Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. *Enzyme Inhibitors and Activators*. InTech. <https://doi.org/10.5772/65934>.
- Quan, J., Tian, J., 2011. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat. Protoc.* <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.181>.
- Ribeiro, L.F.C., De Lucas, R.C., Vitosque, G.L., Ribeiro, L.F., Ward, R.J., Rubio, M.V., Damásio, A.R.L., Squina, F.M., Gregory, R.C., Walton, P.H., Jorge, J.A., Prade, R.A., Buckridge, M.S., Polizeli, M.D.L.T.M., 2014. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. *Biotechnol. Biofuels* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-115>.
- Rocha-Martín, J., Martínez-Bernal, C., Pérez-Cobas, Y., Reyes-Sosa, F.M., García, B.D., 2017. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.132>.
- Saleem, A., Waris, S., Ahmed, T., Tabassum, R., 2021. Biochemical characterization and molecular docking of cloned xylanase gene from *Bacillus subtilis* RTS expressed in *E. coli*. *Int. J. Biol. Macromol.* 168, 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.001>.
- Saleh, S.A.A., Abdel Wahab, W.A., El-Dein, A.N., Abdelwahab, W.A., Ahmed, A.A.M., Helmy, W.A., Mostafa, F.A., 2021. Characterization of *Aspergillus niger* MK981235 xylanase with extraction of anti-hepatotoxic, antioxidant, hypocholesterolemic and prebiotic Corchorus olitorius stems xylooligosaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 166, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.225>.
- Savitzky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627–1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>.
- Sayed Jamaludin, S.I., Syed Abd Kadir, S.A., Krishnan, J., Safri, N.H.M., 2013. Optimization of enzymatic hydrolysis of kitchen waste using response surface methodology (RSM) for reducing sugar production. *BEIAC 2013 - 2013 IEEE Bus. Eng. Ind. Appl. Colloq.* 322–326. <https://doi.org/10.1109/BEIAC.2013.6560140>.
- Segato, F., Damásio, A.R.L., de Lucas, R.C., Squina, F.M., Prade, R.A., 2014. Genomics review of holocellulose deconstruction by aspergilli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 588–613. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-14>.
- Shah, V., Pierre, B., Kirtadze, T., Shin, S., Kim, J.R., 2017. Stabilization of *Bacillus circulans* xylanase by combinatorial insertional fusion to a thermophilic host protein. *Protein Eng. Des. Sel.* 30, 281–290. <https://doi.org/10.1093/protein/gzw081>.
- Sharma, M., Mahajan, C., Bhatti, M.S., Chadha, B.S., 2016. Profiling and production of hemicellulases by thermophilic fungus *Malbranchea flava* and the role of xylanases in improved bioconversion of pretreated lignocellulosics to ethanol. *3 Biotech* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0325-2>.
- Shi, H., Zhang, Y., Li, X., Huang, Y., Wang, L., Wang, Y., Ding, H., Wang, F., 2013. A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca²⁺ from *Thermotoga thermarum*: Cloning, expression and characterization. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-26>.
- Shibata, N., Suetsugu, M., Kakeshita, H., Igarashi, K., Hagihara, H., Takimura, Y., 2017. A novel GH10 xylanase from *Penicillium* sp. accelerates saccharification of alkaline-pretreated bagasse by an enzyme from recombinant *Trichoderma reesei* expressing *Aspergillus* β-glucosidase. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0970-2>.
- Sindrewicz, P., Li, X., Yates, E.A., Turnbull, J.E., Lian, L.Y., Yu, L.G., 2019. Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47658-8>.
- Siqueira, G., Várnai, A., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2013. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. *Appl. Energy* 102, 399–402. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.029>.
- Song, H.T., Gao, Y., Yang, Y.M., Xiao, W.J., Liu, S.H., Xia, W.C., Liu, Z.L., Yi, L., Jiang, Z. B., 2016. Synergistic effect of cellulase and xylanase during hydrolysis of natural lignocellulosic substrates. *Bioresour. Technol.* 219, 710–715. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.035>.
- Soozanipour, A., Taheri-Kafrani, A., Landarani Isfahani, A., 2015. Covalent attachment of xylanase on functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chem. Eng. J.* 270, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.032>.
- Takita, T., Nakatani, K., Katano, Y., Suzuki, M., Kojima, K., Saka, N., Mikami, B., Yatsunami, R., Nakamura, S., Yasukawa, K., 2019. Increase in the thermostability of GH11 xylanase XynJ from *Bacillus* sp. strain 41M-1 using site saturation mutagenesis. *Enzyme Microb. Technol.* 130, 109363. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109363>.
- Taneja, K., Gupta, S., Chander Kuhad, R., 2002. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkaliphilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresour. Technol.* 85, 39–42. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00064-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00064-0).
- Tian, D., Chandra, R.P., Lee, J.S., Lu, C., Saddler, J.N., 2017. A comparison of various lignin-extraction methods to enhance the accessibility and ease of enzymatic hydrolysis of the cellulosic component of steam-pretreated poplar. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0846-5>.
- Turner, T.L., Zhang, G.C., Kim, S.R., Subramaniam, V., Steffen, D., Skory, C.D., Jang, J. Y., Yu, B.J., Jin, Y.S., 2015. Lactic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without PDC or ADH deletion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8023–8033. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6701-3>.
- Uday, U.S.P., Majumdar, R., Tiwari, O.N., Mishra, U., Mondal, A., Bandyopadhyay, T.K., Bhunia, B., 2017. Isolation, screening and characterization of a novel extracellular xylanase from *Aspergillus niger* (KP874102.1) and its application in orange peel hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* 105, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.066>.
- Ullah, S.F., Souza, A.A., Hamann, P.R.V., Ticona, A.R.P., Oliveira, G.M., Barbosa, J.A.R. G., Freitas, S.M., Noronha, E.F., 2019. Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. *Int. J. Biol. Macromol.* 127, 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.057>.
- Ustinov, B.B., Gusakov, A.V., Antonov, A.I., Sinityn, A.P., 2008. Comparison of properties and mode of action of six secreted xylanases from *Chrysosporium lucknowense*. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.01.017>.
- Van Den Brink, J., De Vries, R.P., 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2>.
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biortechadv.2012.03.002>.
- van Gool, M.P., van Muiswinkel, G.C.J., Hinz, S.W.A., Schols, H.A., Sinityn, A.P., Gruppen, H., 2013. Two novel GH11 endo-xylanases from *Myceliophthora thermophila* C1 act differently toward soluble and insoluble xylans. *Enzyme Microb. Technol.* 53, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.019>.
- Vanijtinda, G., Nimchua, T., Sukyai, P., 2019. Effect of xylanase-assisted pretreatment on the properties of cellulose and regenerated cellulose films from sugarcane bagasse. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 503–516. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.191>.
- Vazquez-Ortega, P.G., Alcaraz-Fructuoso, M.T., Rojas-Contreras, J.A., López-Miranda, J., Fernandez-Lafuente, R., 2018. Stabilization of dimeric β-glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 110, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.12.007>.
- Wallace, B.A., Janes, R.W., 2009. Modern Techniques for Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy, Vol. 1. IOS press ed.
- Wang, X., Huang, H., Xie, X., Ma, R., Bai, Y., Zheng, F., You, S., Zhang, B., Xie, H., Yao, B., Luo, H., 2016. Improvement of the catalytic performance of a hyperthermostable GH10 xylanase from *Talaromyces leycettianus* JCM12802. *Bioresour. Technol.* 222, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.003>.
- Wang, H., Li, Z., Liu, H., Li, S., Qiu, H., Li, K., Luo, X., Song, Y., Wang, N., He, H., Zhou, H., Ma, W., Zhang, T., 2017. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a novel GH11 xylanase from saline-alkali soil with excellent

- tolerance to high pH, high salt concentrations and ethanol. *Protein Expr. Purif.* 139, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.003>.
- Wang, K., Cao, R., Wang, M., Lin, Q., Zhan, R., Xu, H., Wang, S., 2019. A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a xylanolytic *Bacillus* strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1.5 L in pretreated corn stover hydrolysis. *Biotechnol. Biofuels* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1389-8>.
- Wu, Q., Fan, G., Yu, T., Sun, B., Tang, H., Teng, C., Yang, R., Li, X., 2019. Biochemical characteristics of the mutant xylanase T-XynC(122)C(166) and production of xylooligosaccharides from corncobs. *Ind. Crops Prod.* 142, 111848 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111848>.
- Wu, X., Zhang, S., Zhang, Q., Zhao, Y., Chen, G., Guo, W., Wang, L., 2020. The contribution of specific subsites to catalytic activities in active site architecture of a GH11 xylanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 8735–8745. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10865-9>.
- Xing, H., Zou, G., Liu, C., Chai, S., Yan, X., Li, X., Liu, R., Yang, Y., Zhou, Z., 2021. Improving the thermostability of a GH11 xylanase by directed evolution and rational design guided by B-factor analysis. *Enzyme Microb. Technol.* 143, 109720 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109720>.
- Xiong, H., Nyyssölä, A., Jänis, J., Pastinen, O., Von Weymarn, N., Leisola, M., Turunen, O., 2004. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.04.003>.
- Xu, X., Liu, M.Q., Huo, W.K., Dai, X.J., 2016. Obtaining a mutant of *Bacillus amyloliquefaciens* xylanase A with improved catalytic activity by directed evolution. *Enzyme Microb. Technol.* 86, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.001>.
- Yang, J., Ma, T., Shang-guan, F., Han, Z., 2020. Improving the catalytic activity of thermostable xylanase from *Thermotoga maritima* via mutagenesis of non-catalytic residues at glycone subsites. *Enzyme Microb. Technol.* 139, 109579 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109579>.
- Zhang, J., Moilanen, U., Tang, M., Viikari, L., 2013. The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-18>.
- Zhang, H., Li, J., Wang, J., Yang, Y., Wu, M., 2014. Determinants for the improved thermostability of a mesophilic family 11 xylanase predicted by computational methods. *Biotechnol. Biofuels* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-3>.
- Zhang, W., Pan, K., Liu, C., Qu, M., OuYang, K., Song, X., Zhao, X., 2020. Recombinant Lentinula edodes xylanase improved the hydrolysis and in vitro ruminal fermentation of soybean straw by changing its fiber structure. *Int. J. Biol. Macromol.* 151, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.187>.
- Zhou, J., Shi, P., Zhang, R., Huang, H., Meng, K., Yang, P., Yao, B., 2011. Symbiotic *Streptomyces* sp. TN119 GH 11 xylanase: a new pH-stable, protease- and SDS-resistant xylanase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 523–530. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0795-5>.
- Zhou, J., Gao, Y., Dong, Y., Tang, X., Li, J., Xu, B., Mu, Y., Wu, Q., Huang, Z., 2012. A novel xylanase with tolerance to ethanol, salt, protease, SDS, heat, and alkali from actinomycete *Lechevalieria* sp. HJ3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 965–975. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1113-1>.
- Zhou, Z., Lei, F., Li, P., Jiang, J., 2018. Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: a comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 2683–2702. <https://doi.org/10.1002/bit.26788>.
- Zou, G., Bao, D., Wang, Ying, Zhou, S., Xiao, M., Yang, Z., Wang, Yinmei, Zhou, Z., 2021. Alleviating product inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase complex with a product-activated mushroom endoglucanase. *Bioresour. Technol.* 319, 124119 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124119>.

Article

LPMO AfAA9_B and Cellobiohydrolase AfCel6A from *A. fumigatus* Boost Enzymatic Saccharification Activity of Cellulase Cocktail

Aline Vianna Bernardi ¹ , Luis Eduardo Gerolamo ¹ , Paula Fagundes de Gouvêa ¹ ,
Deborah Kimie Yonamine ¹ , Lucas Matheus Soares Pereira ¹ , Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira ¹,
Sérgio Akira Uyemura ² and Taisa Magnani Dinamarco ^{1,*}

¹ Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-901, Brazil; alinebernardi@gmail.com (A.V.B.); gerolamo00@hotmail.com (L.E.G.); paulafagouvea@yahoo.com.br (P.F.d.G.); deborah.yonamine@hotmail.com (D.K.Y.); lucas.matheus.pereira@usp.br (L.M.S.P.); arthurdeoliveira@ffclrp.usp.br (A.H.C.d.O.)

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-903, Brazil; suyemura@fcrp.usp.br

* Correspondence: tdinamarco@ffclrp.usp.br; Tel.: +55-16-3315-9121; Fax: +55-16-3315-9101

Citation: Bernardi, A.V.; Gerolamo, L.E.; de Gouvêa, P.F.; Yonamine, D.K.; Pereira, L.M.S.; de Oliveira, A.H.C.; Uyemura, S.A.; Dinamarco, T.M. LPMO AfAA9_B and Cellobiohydrolase AfCel6A from *A. fumigatus* Boost Enzymatic Saccharification Activity of Cellulase Cocktail. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 276. <https://doi.org/10.3390/ijms22010276>

Received: 3 December 2020

Accepted: 24 December 2020

Published: 29 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cellulose is the most abundant polysaccharide in lignocellulosic biomass, where it is interlinked with lignin and hemicellulose. Bioethanol can be produced from biomass. Since breaking down biomass is difficult, cellulose-active enzymes secreted by filamentous fungi play an important role in degrading recalcitrant lignocellulosic biomass. We characterized a cellobiohydrolase (AfCel6A) and lytic polysaccharide monooxygenase LPMO (AfAA9_B) from *Aspergillus fumigatus* after they were expressed in *Pichia pastoris* and purified. The biochemical parameters suggested that the enzymes were stable; the optimal temperature was ~60 °C. Further characterization revealed high turnover numbers (k_{cat} of 147.9 s⁻¹ and 0.64 s⁻¹, respectively). Surprisingly, when combined, AfCel6A and AfAA9_B did not act synergistically. AfCel6A and AfAA9_B association inhibited AfCel6A activity, an outcome that needs to be further investigated. However, AfCel6A or AfAA9_B addition boosted the enzymatic saccharification activity of a cellulase cocktail and the activity of cellulase Af-EGF7. Enzymatic cocktail supplementation with AfCel6A or AfAA9_B boosted the yield of fermentable sugars from complex substrates, especially sugarcane exploded bagasse, by up to 95%. The synergism between the cellulase cocktail and AfAA9_B was enzyme- and substrate-specific, which suggests a specific enzymatic cocktail for each biomass by up to 95%. The synergism between the cellulase cocktail and AfAA9_B was enzyme- and substrate-specific, which suggests a specific enzymatic cocktail for each biomass.

Keywords: GH6 cellobiohydrolase; AA9 LPMO; lignocellulose hydrolysis; bioethanol

1. Introduction

Fossil fuel depletion, increasing energy consumption, growing CO₂ emissions, and climate change have increased the demand for renewable energy sources. In this scenario, lignocellulosic residues stand out as a new generation of renewable energy sources, including second-generation (2G) ethanol [1–5]. Lignocellulosic biomass-derived biofuels can potentially substitute fossil fuels with the advantage that they can help to reduce the emission of greenhouse gases and global warming [6,7]. Every year, tons of agricultural residues, such as byproducts of sugarcane, corn, wheat, rice, and barley, are generated worldwide and have emerged as the most promising feedstock to produce biofuels by hydrolysis and subsequent fermentation [8].

The composition of the plant cell wall varies in terms of the percentage of cellulose (35–50%), hemicellulose (20–30%), and lignin (20–30%). The wall lignocellulosic structure is recalcitrant and resists chemical and biological treatments. Cellulose, a crystalline

homopolysaccharide, is made up of thousands of D-glucose subunits linked by β -1,4-glycosidic bonds, forming linear chains. The cellulose chains are bound through intra- and intermolecular hydrogen bonds, creating insoluble microfibrils [9]. The recalcitrant structure of the plant cell wall matrix makes the release of soluble sugars challenging [10].

Industrial processes that produce ethanol from cellulose require that mixtures of fungal cellulases be employed, so that soluble sugars are released for further fermentation into bioethanol [7,11]. These enzymes work synergistically to break down polysaccharides and crystalline cellulose [12,13]. First, endoglucanases (EGL, EC 3.2.1.4) hydrolyze β -1,4-glucosidic bonds in amorphous regions of the cellulose chains, to release cello-oligosaccharides; cellobiohydrolases (CBH; EC 3.2.1.91) act on short cellulose molecules and cello-oligosaccharides, releasing disaccharide units like cellobiose. Then, β -glucosidases (BG; EC 3.2.1.21) cleave cellobiose into glucose for further fermentation. Together, these enzymes are part of an enzymatic cocktail and are used to break down lignocellulose.

In contrast to cellulases, lytic polysaccharide monooxygenases (LPMO; EC: 1.14.99.53–56) degrade cellulose by an oxidative mechanism and enhance accessibility to cellulose, improving the hydrolytic performance of cellulases [14–16]. LPMOs are copper-dependent enzymes that act on crystalline cellulose and other polysaccharides in nature, to generate oxidized and non-oxidized chain ends. In addition, LPMO is a virulence factor in fungal meningitis [17].

The fact that LPMO boosts the activity of hydrolytic enzymes during chitin degradation was first described in 2005 [18]. The LPMO activity on cellulose and other biomasses has also been reported [19,20]. The copper ion in the LPMO catalytic structure is coordinated to three nitrogen atoms of the two conserved histidine residues in a histidine brace, which is essential for LPMO activity [21–27]. The LPMO oxidative mechanism is not fully understood, but analysis of reaction products has revealed that LPMO hydroxylates carbon C1 or C4, or both. To initiate oxidative cleavage, an enzyme, such as cellobiose dehydrogenase, or a small reductor molecule must reduce the LPMO copper center. Subsequently, the enzyme reacts with a co-substrate (O_2 or H_2O_2), to form oxygen species that can hydroxylate C1 or C4 in the glycosidic bond [28,29].

Some studies have described inhibitory results or no synergism between LPMOs and cellulases. For example, *Hj*LPMO9A addition to accellerase elicits no synergism until 100 h [30]. Moreover, *Nc*LPMO9F reduces CBHI efficiency in the degradation of mixed amorphous-crystalline cellulosic substrate (MACS) [31]. *Mt*LPMO9L affects CBHI and CBHII differently depending on the ratio between the enzymes, substrate characteristics, and incubation time. These data highlight that understanding the synergistic mechanism between LPMO and GHs is still necessary and will be helpful for the development of novel cellulase mixtures.

Enzymes from thermophilic microorganisms offer several advantages for industrial applications. For example, *Aspergillus fumigatus* produces thermophilic CAZymes, which have high cellulolytic activity and stability in a wide range of pH and at elevated temperatures, unlike commercial fungal cellulases [32–35].

To characterize the association of cellulases (*Af*Cel6A and *Af*-EGL7) and LPMO (*Af*AA9_B) from *A. fumigatus*, we evaluated their action on the degradation of different biomasses on a pilot scale. *Af*Cel6A is a cellobiohydrolase from the glycoside hydrolase (GH) class, family 6; it acts exclusively on nonreducing ends of cellulosic polymers. *Af*-EGL7 is a previously characterized endoglucanase that can potentially hydrolyze biomass [32,36].

Here, we present the biochemical characterization of *Af*Cel6A and *Af*AA9_B after they are expressed in *Pichia pastoris*. We will show that supplementation of enzymatic cocktails can enhance the production of fermentable sugars, and that LPMOs have a critical role in biomass hydrolysis. In addition, we evaluate the synergistic effect between *Af*AA9_B and cellulases (*Af*Cel6A and *Af*-EGL7) and show different effects for the two enzymes.

2. Results and Discussion

Enzymatic biomass hydrolysis underlies most of the cost involved in biofuel production [37,38]. Different commercially available cellulolytic cocktails such as Novozyme, Du-Pont-Genencor, and Dyadic are still expensive. These cocktails consist of several enzymes that promote complete lignocellulosic biomass conversion into fermentable sugars [39,40]. However, widely variable biomasses are available for biorefinery purposes; e.g., wheat straw, rice straw, corncob, cotton-stalk, and sugar cane bagasse, so these commercial cocktails may not have the same efficiency for all feedstocks [41].

Developing cheaper and more effective enzymatic cocktails for hydrolysis of different biomasses is one of the major interests of researchers devoted to biomass conversion. Such cocktails can only be achieved by reducing the amount of enzymes that is required for hydrolysis, by bioprospecting and characterizing new enzymes, and by developing new enzyme mixtures [42]. Moreover, the addition of an extra enzyme increases hydrolysis performance by increasing the release of fermentable sugars and reducing the time of hydrolysis.

LPMO (*AfAA9_B*) and Cellobiohydrolase GH6 (*AfCel6A*) from *A. fumigatus* and expressed in *Escherichia coli* and *Aspergillus oryzae*, respectively, have been described [35,43]. However, to evaluate the action of the combined enzymes, we characterized and analyzed their biochemical properties after expressing them in *Pichia pastoris*, and we detected some differences.

2.1. Expression and Purification of Recombinant *AfCel6A* and *AfAA9_B*

We successfully expressed recombinant *AfCel6A* and *AfAA9_B* in *P. pastoris* X-33. After induction for 144 h, we collected, concentrated, and purified the culture supernatants on Ni²⁺ Sepharose 6 Fast Flow resin (Ge Healthcare, Little Chalfont, UK). SDS-PAGE revealed that the purified recombinant *AfCel6A* and *AfAA9_B* had apparent molecular masses of approximately 65 and 30 kDa, respectively (Figure 1). After Endo H treatment, the molecular mass of *AfCel6A* remained almost the same, while *AfAA9_B* migrated as a band of approximately 26 kDa. Analyses of potential N-glycosylation sites by the NetNGlyc 1.0 program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) suggested that a potential site was present at position N413 in *AfCel6A* and N159 in *AfAA9_B*, confirmed by deglycosylation of the recombinant proteins by the enzyme Endoglycosidase H. The presence of N-glycans at different sites in the structure of the enzyme can influence enzymatic properties, such as secretion, folding, and stability, among others [44].

Figure 1. SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) analysis of the purified recombinant *AfCel6A* and *AfAA9_B*. Lane M, molecular mass standards (Precision™ Protein Standards Dual Color—BioRad); lane 1, purified recombinant *AfCel6A*; lane 2, deglycosylated *AfCel6A*; lane 3, purified recombinant *AfAA9_B*; lane 4, deglycosylated *AfAA9_B*.

We excised the purified *AfAA9_B* from the gel and analyzed it on the LC-MS/MS Xevo TQS (Waters) system at the Multi-User Laboratory of Mass Spectrometry, which confirmed that the enzyme was LPMO (Table 1).

Table 1. Peptide sequences.

Protein Gene	Peptide Sequence	Precursor M _z	Precursor Charge	Product M _z	Product Charge
AFUA_4G07850	ITSIAGLLASASLVAGHGFVSGIVADGK	871.675226	3	1049.562586	1
AFUA_4G07850	ITSIAGLLASASLVAGHGFVSGIVADGK	871.675226	3	992.541122	1
AFUA_4G07850	ITSIAGLLASASLVAGHGFVSGIVADGK	871.675226	3	845.472708	1
AFUA_4G07850	ITSIAGLLASASLVAGHGFVSGIVADGK	871.675226	3	746.404294	1
AFUA_4G07850	ITSIAGLLASASLVAGHGFVSGIVADGK	871.675226	3	659.372266	1
AFUA_4G07850	ITSIAGLLASASLVAGHGFVSGIVADGK	871.675226	3	602.350802	1
AFUA_4G07850	NTDPGIK	372.912411	2	630.345717	1
AFUA_4G07850	NTDPGIK	372.912411	2	529.298038	1
AFUA_4G07850	NTDPGIK	372.912411	2	414.271095	1
AFUA_4G07850	NTDPGIK	372.912411	2	317.218332	1

2.2. Structural Analysis and Predictions by Circular Dichroism (CD)

LPMOs comprise a group of redox enzymes that belong to the auxiliary activity (AA) class (families 9–16, except 12) [45] and which bear a β -sandwich core (presence of 8–10 β -strands). The catalytic region of the enzyme is known as histidine brace [21,24,46], which contains many loops and accounts for the active site topology and substrate specificity. Specificity is due to the presence of aromatic residues and their weak interactions with polysaccharides [22,47]. Figure 2a shows the crystallized structure of LPMO *AfAA9_B* (PDB: 5 × 6A), where the active site residues H1, H86, and Y175 in the histidine brace are highlighted.

Due to its tunnel-shaped catalytic structure, *AfCel6A* acts exclusively on nonreducing ends of cellulosic polymers. The cellulosic polymers enter this catalytic structure through one of their extremities, and *AfCel6A* continuously cleaves the long chains into small cellobiose units via anomeric inversion (Figure 2c). The enzymatic core consists of a distorted α/β -barrel motif. Few parallel β -strands in sandwich conformation are connected by several loops, which are rich in α -helices [48–50]. As depicted in Figure 2c, *AfCel6A* contains N-terminal CBM1 (carbohydrate-binding module) as well as the main residues involved in catalysis, namely Q229, P268, V217, N265, A269 [48], D165, D211, and D390 (determined by the Pfam database [51]).

Since the 1980s, thousands of three-dimensional protein structures have been resolved and deposited in the Protein Data Bank (PDB), allowing more detailed insights into the structure and function of proteins, including protein complexes [52]. However, performing structural studies under the conditions in which proteins actually operate (i.e., generally in solution), as well as under other conditions, is crucial, and providing measures of the rates of structural changes in proteins, which are often essential to their biological function [52], is vital. Circular dichroism (CD) has become increasingly recognized as a valuable structural technique for addressing these issues [52]. In this sense, the first important information to be obtained is whether the structure of the expressed proteins in solution corresponds to crystal or modeled structures. To this end, we obtained the secondary structure content on the basis of on circular dichroism spectra, from which we predicted the secondary structures of the enzymes by using BESTSEL [53]. This analysis showed substantial structural similarity between the enzymes and their templates from PDB:5X6A resolved by Q. Shen (unpublished) (for *AfAA9_B*) [54] and Phyre2 web server [55] (for *AfCel6A*), as displayed in Figure 2 and Supplementary Table S1.

Figure 2. Ribbon representation of the enzymes AfAA9_B (a) and AfCel6A (c) and their main conserved residues and structures. Active site residues are represented in yellow, and disulfide bonds are represented in orange. AfAA9_B loops are represented by LC (C-terminus), LS (short), L3, and L2. CBM1 residues are indicated by a brace in AfCel6A. Circular dichroism spectra obtained from 190 to 250 nm (UV-distant) for AfAA9_B with Cu(II) (b) and AfCel6A (d) at 25 °C. Both enzymes were in 20 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.4), and the spectra were read by using a quartz cuvette with an optical path of 0.1 cm. The mean spectra for each sample were normalized by subtracting the buffer spectrum.

The CD spectrum of AfAA9_B and its predicted secondary structures (Figure 2b) demonstrated that the enzyme consisted of 8.3% α -helices and 31.4% β -strands. These values reinforced that LPMOs present a large number of β -strands in their cores, reflected by the well-defined negative peak at 218 nm, the small peak at 190 nm, and the approximated single band profile. Small negative peaks around 208 nm also evidenced the small number of helices [56]. Compared to the expected values based on the PDB: 5X6A structure, the percentage of β -strands was exactly the same, while the percentage of α -helices was -4.3% . TaLPMO9A (PDB: 2YET) [26], an LPMO from *Thermoascus aurantiacus*, has been reported to share 71% identity with AfAA9_B and to present similar proportions of α -helices and β -strands: 30.8% and 15.0%, respectively.

AfCel6A presented 27.0% α -helix and 7.7% β -strands, as estimated by BeStSel (Figure 2d). The accentuated peak at 190 nm and the two negative peaks near 208 nm and 222 nm indicated a large number of α -helices. The absence of a negative peak at approximately 218 nm and a single band profile are typical of proteins with low content of β -strands [56]. On the basis of the proportions of α -helices and β -strands estimated by Phyre2 [55] and the Kabsch and Sander method [57] for the modeled structure (Figure 2c), the differences were -4.3% and -1.0% , and -1.0% and -2.3% , respectively. The enzyme Cel6A from *Trichoderma reesei* (PDB:1QJW), which shares 69% identity, presents a similar proportion of 35.8% α -helices and 8.7% β -strands [58]. Furthermore, a cellobiohydrolase from a different *A. fumigatus* strain that shares 99% identity with AfCel6A consists of 26.0%

α -helix and 15.4% β -strands, confirming that the prediction based on the CD spectrum is remarkably close.

Therefore, CD analysis of both enzymes obtained herein evidenced that their secondary structure profiles resembled the profiles described in the literature. This indicated that both enzymes were correctly folded during heterologous expression, and that their structures were maintained after they were purified.

Confirming that the structure of wild enzymes in solution corresponds to the structure obtained by crystallography or modeling allows enzymes to be efficiently improved by protein engineering. To increase the catalytic efficiency of cocktails, alterations modeled on the protein structure can be accompanied by spectroscopic studies in solution, allowing improved activity to be directly associated with conformational changes in the structure of the enzyme.

2.3. Enzymatic Properties of AfCel6A and AfAA9_B

We used CM-Cellulose and 2,6-DMP as substrates to determine the enzymatic properties of AfCel6A and the activity of AfAA9_B, respectively.

The optimal temperature for AfCel6A activity was 55–60 °C, and the enzyme retained over 54% of the maximum activity between 40 and 65 °C. At 70, 75, and 80 °C, AfCel6A maintained 43.5%, 30%, and 26% of the maximum activity, respectively (Figure 3a). Most characterized cellobiohydrolases, shown in Table 2, were also active at these temperatures. We studied the AfCel6A thermal stability after preincubating it at 50, 60, 70, 80, or 90 °C for different times (Figure 3b). The enzyme was stable after 30 min and retained 57.5%, 42.0%, 40.4%, and 26.9% of the initial activity at 60, 70, 80, and 90 °C, respectively. AfCel6A maintained about 30% of the initial activity at 60–80 °C. However, the enzyme was completely inactivated after 5 h at 60–80 °C. AfCel6A was stable at 50 °C. It lost only 30% of its original activity after 24 h and retained 64.2% and 47.7% of its initial activity after 48 and 72 h, respectively (Figure 3c). These results showed that AfCel6A was stable at high temperatures, especially at 50 °C. In another study, after expression in *A. oryzae*, AfCel6A was stable at 60 °C, but it completely lost its activity at 70 °C [35]. Therefore, AfCel6A was more stable after expression in *P. pastoris* than in *A. oryzae*.

Figure 3. Temperature effects on AfCel6A and AfAA9_B activity and stability. (a) AfCel6A temperature-activity profiles at optimal pH for 45 min. (b) AfCel6A thermostability at • 50, ■ 60, ▲ 70, × 80, and ◆ 90 °C for different times. (c) AfCel6A thermostability at 50 °C for up to 72 h. (d) AfAA9_B thermostability at • 50 and ■ 60 °C for 72 h. Each value in the panel represents the mean of three experiments.

Table 2. Comparison among catalytic and biochemical properties of GH6 cellobiohydrolases.

Source Organism	Enzyme Name	Expression System	Substrate	V _{max}	K _M	k _{cat}	k _{cat} /K _M	Optimal T	Optimal pH	Thermal Stability	pH Stability	Ref.
<i>Aspergillus fumigatus</i> AP293	AFCel6A	<i>Pichia pastoris</i>	CMC-Na	195.2 ± 4.65 U mg ^{−1}	7.44 ± 0.51 g/L	147.9 s ^{−1}	19.9 mL mg ^{−1} s ^{−1}	55–60 °C	pH 5.5–6.5	>70% after 24 h at 50 °C; >90% after 1 h at 60 °C; 60–80 °C after 30 min at 90 °C	More than 70% at pH 3.0–10.0 after 72 h	This study
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AFCel6A	<i>Aspergillus oryzae</i>	Avicel PH101	-	48.6 ± 14.8 g L ^{−1}	0.9 ± 0.1 s ^{−1}	-	70 °C	-	No loss at 60 °C after 1 h	-	[35]
<i>Aspergillus terreus</i>	ATCel6A	<i>Aspergillus oryzae</i>	Avicel PH101	-	-	-	-	50 °C	-	>90% after 1 h at 50 °C	-	[35]
<i>Talaromyces funiculosus</i>	TjCel6A	<i>Aspergillus oryzae</i>	Avicel PH101	-	21.6 ± 3.2 g L ^{−1}	0.5 ± 0.02 s ^{−1}	-	60 °C	-	No loss at 50 °C after 1 h	-	[35]
<i>Colletotrichum gamsicola</i>	CgCel6A	<i>Aspergillus oryzae</i>	Avicel PH101	-	-	-	-	40 °C	-	>90% after 1 h at 40 °C	-	[35]
	CgCel6B	<i>Aspergillus oryzae</i>	Avicel PH101	-	89.0 ± 13.2 g L ^{−1}	1.8 ± 0.2 s ^{−1}	-	50 °C	-	>90% after 1 h at 50 °C	-	[35]
	TjCel6A	<i>Aspergillus oryzae</i>	Avicel PH101	-	24.3 ± 4.0 g L ^{−1}	0.6 ± 0.04 s ^{−1}	-	70 °C	-	No loss at 50 °C after 1 h	-	[35]
<i>Trichoderma reesei</i>	Cel6A ¹	<i>Pichia pastoris</i>	CMC-Na	10.7 mmol min ^{−1} mg ^{−1}	0.31 mg mL ^{−1}	-	-	60 °C	pH 5.5	90% after 30 min at 60 °C	-	[59]
	Cel6A ²	<i>Pichia pastoris</i>	PASC	-	-	-	-	55 °C	pH 5.5–6.0	100% at 40 °C and 50% at 60 °C after 30 min	No loss at pH 5.0–6.0; rapid inactivation at more alkaline pH; and some instability at more acidic pH after 30 min	[60]
<i>Magnaporthe oryzae</i> Ino72	CBHII	-	PASC	10 U mg ^{−1}	3.8 mg mL ^{−1}	-	-	60 °C	pH 5.0	80% after 30 min at 60 °C	Stable at pH 3.5–6.0 after 30 min	[61]
	McCel6A	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Cellobiose	454.5 µg min ^{−1} mg ^{−1}	24.3 mM	-	-	40 °C	pH 9.0	-	-	[62]
	CBH II	<i>Escherichia coli</i>	Collopentaose	63.3 µg min ^{−1} mg ^{−1}	3.3 mM	-	-	50 °C	pH 5.0	-	-	[63]
<i>Pentacillium octaisis</i> Pol 6	CBH II	-	pNPC	-	5 mM	-	-	65 °C	pH 4.0–5.0	Stable at pH 2.0–9.0 after 24 h	-	[64]
<i>Talaromyces emersonii</i>	CBH II	-	CNPG ₃	9.1 U mg ^{−1}	4.5 mM	8.9 s ^{−1}	1.9 mM ^{−1} s ^{−1}	68 °C	pH 3.8	t _{1/2} = 38 min at 80 °C (pH 5.0)	t _{1/2} = 38 min at pH 5.0 (80 °C)	[65]
<i>Trichoderma viride</i> CICC13038	CBH II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CMC-Na	-	-	-	-	70 °C	pH 5.0	-	-	[66]
<i>Nocardia strictum</i> J11	J11 CelA	<i>Escherichia coli</i>	Barley β-glucan	-	-	-	-	50 °C	pH 6.0	More than 70% at up to 50 °C and approximately 50% at 70 °C after 1 h	More than 80% at pH 5.2–11.3, and approximately 70% at pH 3.0, 4.2, and 12.3, after 1 h	[67]
<i>Irpet. lacteus</i> MC-2	Ex-4	<i>Pichia pastoris</i>	PASC	-	-	-	-	50 °C	pH 5.0	More than 80% at 60 °C (pH 3.0–8.0) after 1 h	More than 80% at pH 3.0–8.0 (60 °C) after 1 h	[68]
<i>Chaetomium thermophilum</i> HSAUT ₀₇₂₆₅₁	CBH II	<i>Pichia pastoris</i>	pNPC	-	-	-	-	50 °C	pH 4.0	No loss at 50 °C; approximately 20% at 60 °C; and complete inactivation at 80 °C after 1 h	-	[69]

The optimal temperature for *AfAA9_B* activity was 60 °C (data not shown). *AfAA9_B* was stable at 50 and 60 °C and retained over 75% and 20% of its initial activity, respectively (Figure 3d). Like *AfAA9_B*, other LPMOs were stable at 50 and 60 °C; e.g., PMO9D_SCYTH, PMO9D_MALCI, MfLPMO9D, MfLPMO9J, and MfLPMO9A (Table 3).

Figure 4 illustrates how pH influenced *AfCel6A* and *AfAA9_B*. The highest *AfCel6A* activity emerged at pH 5.5–6.0, but it was active in a narrow pH range (pH 4.0–7.5) and retained >50% of maximum activity therein (Figure 4a).

Figure 4. pH effects on the enzymatic activity and stability of purified recombinant *AfCel6A* and *AfAA9_B*. (a) *AfCel6A* pH-activity profile. (b) pH stability of *AfCel6A* after • 24, ■ 48, and ▲ 72 h of preincubation at 4 °C. The enzyme activities were measured under standard conditions. (c) *AfAA9_B* pH-activity profile. (d) pH stability of *AfAA9_B* after • 24, ■ 48, and ▲ 72 h of preincubation at 4 °C. Each value in the panel represents the mean of three experiments.

Many cellobiohydrolases seem to belong to the class of acidic enzymes, with optimal pH ranging from 3.9 to 6.0; for example, CBH II from *Talaromyces emersonii* (pH 3.8), Cel6D (pH 3.9), CBH II from *Chaetomium thermophilum* (pH 4.0), CBH II from *Penicillium occitanis* (pH 3.0–5.0), CBH II from *Trichoderma viride* (pH 5.0), J11 CelA (pH 6.0), and EX4 (pH 5.0). Only one GH6 has been classified as active at pH 9.0: MoCel6A from *Magnaporthe oryzae* (Table 2).

We also investigated *AfCel6A* pH stability (Figure 4b). Notably, *AfCel6A* was stable at pH ranging between 3 and 10 and retained over 70% of its original activity after 72 h. Compared to other GH6 cellobiohydrolases, *AfCel6A* was more stable over a wide pH range, whereas others had narrower range of pH stability—CBH II from *Talaromyces emersonii* (38 min at pH 5.0), Cel6D (over 60% activity at pH 4.0–6.0 and 47 °C and complete inactivation at pH 4.0 and 55 °C), CBH II from *Penicillium occitanis* (24 h at pH 2.0–9.0), J11 CelA (1 h), and EX4 (over 80% activity at pH 3.0–8.0 at 60 °C for 1 h).

AfAA9_B showed the highest activity at pH 9.0. At pH 10.0, it retained >74.0% of its activity (Figure 4c). The optimal *AfAA9_B* pH was pH 9.0, but this enzyme was stable at pH ranging between 5.0 and 10.0 and maintained 100% of the original activity after 72 h (Figure 4d). Compared to PMO9D_SCYTH (pH 7.0) and PMO9D_MALCI (pH 9.0), *AfAA9_B* was more stable, whereas the former LPMOs were stable at a specific pH (Table 3).

Table 3. Comparison among catalytic and biochemical properties of LPMOs.

Source Organisation	Protein Name	Expression System	Substrate	Co-Substrate	V _{max}	K _M	k _{cat}	k _{cat} /K _M	Optimal T	Optimal pH	Thermostability	pH Stability	Ref.
<i>Aspergillus fumigatus</i> A293	A/AΔ ₂ B	<i>Pichia pastoris</i> X33	2,6-DMP	§ H ₂ O ₂	78.52 ± 3.33 U g ^{−1}	2.04 ± 0.24 μM	0.004 s ^{−1}	0.017 μM ^{−1} s ^{−1}	-	***	-	-	This study
				§ H ₂ O ₂	1481 ± 72.19 U g ^{−1}	0.79 ± 0.12 μM	0.64 s ^{−1}	0.81 μM ^{−1} s ^{−1}	-	9	60 °C, 50% after 48 h 50 °C, 100% after 48 h activity after 48 h	No loss of activity at pH 5.0–10.0	
			2,6-DMP	a H ₂ O ₂	49.26 ± 4.48 U g ^{−1}	106.3 ± 27.9 μM	0.021 s ^{−1}	1.98 × 10 ^{−4} μM ^{−1} s ^{−1}	-	-	-	-	
				b H ₂ O ₂	972.5 ± 28.31 U g ^{−1}	12.15 ± 1.76 μM	0.42 s ^{−1}	0.035 μM ^{−1} s ^{−1}	-	-	-	-	
<i>Scytalidium thermophilum</i>	PMO9D_SCYTH		Avicel		0.36 U mg ^{−1}	4.54 mg mL ^{−1}	2.99 × 10 ^{−2} min ^{−1}	6.58 × 10 ^{−3} mg ^{−1} mL min ^{−1}	-	-	-	-	[70]
				CMC	14.96 U mg ^{−1}	10.6 mg mL ^{−1}	1.61 min ^{−1}	1.52 × 10 ^{−1} mg ^{−1} mL min ^{−1}	60 °C	7	60 °C (t _{1/2} = 60.38 h, pH 7.0)	Above 90% after 48 h at pH 7.0	
			2,6-DMP	§ H ₂ O ₂	0.13 U mg ^{−1}	0.51 mM	1.84 × 10 ^{−1} min ^{−1}	3.57 × 10 ^{−1} mM ^{−1} min ^{−1}	-	-	-	-	
				Avicel	0.17 U mg ^{−1}	5.87 mg mL ^{−1}	1.05 × 10 ^{−2} min ^{−1}	1.79 × 10 ^{−3} mg ^{−1} mL min ^{−1}	-	-	-	-	
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	PMO9D_MALCI		CMC		9.59 U mg ^{−1}	26.27 mg mL ^{−1}	0.76 min ^{−1}	2.62 × 10 ^{−2} mg ^{−1} mL min ^{−1}	50 °C	9	50 °C (t _{1/2} = 144 h, pH 7.0)	Above 80% after 72 h at pH 5.0	[71]
				2,6-DMP	0.12 U mg ^{−1}	1.17 mM	1.21 min ^{−1}	1.03 × 10 ^{−1} mM ^{−1} min ^{−1}	-	-	-	-	
			PWS	§ O ₂	-	49.80 g L ^{−1}	3.8 min ^{−1}	*1.85 × 10 ³ M ^{−1} min ^{−1}	-	-	-	-	
			cellobiose	§ O ₂	-	32 μM	10.1 min ^{−1}	0.30 μM ^{−1} min ^{−1}	-	-	-	-	
<i>Myceliophthora thermophila</i>	MfPMO9E	<i>Neurospora crassa</i>	cellobiose	O ₂	-	230 μM	17 min ^{−1}	7.4 × 10 ^{−2} μM ^{−1} min ^{−1}	-	-	-	-	[72,73]
				H ₂ O ₂	-	53 μM	# 15.9 s ^{−1}	3.0 × 10 ⁵ M ^{−1} s ^{−1}	-	-	-	-	
			CNW	§ H ₂ O ₂	1.11 μM s ^{−1}	0.56 mg mL ^{−1}	6.7 s ^{−1}	≈10 ⁶ M ^{−1} s ^{−1}	-	-	-	-	
				§ CNW	-	2.8 μM	-	-	-	-	-	-	
<i>Serratia marcescens</i>	CRP21	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) Star	CNW	§ H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	[74]
				§ CNW	-	-	-	-	-	-	-	-	
			cellobiose	§ O ₂	-	43 μM	0.11 s ^{−1}	2.6 × 10 ³ M ^{−1} s ^{−1}	-	-	-	-	
				H ₂ O ₂	1.11 μM min ^{−1}	11.23 μM	0.642 min ^{−1}	5.7 × 10 ^{−2} μM min ^{−1}	-	-	**** T _{mapp} at pH 7.0 = 68 °C	-	
<i>Myceliophthora thermophila</i>	MfPMO9D	<i>Myceliophthora thermophila</i> CI	2,6-DMP	§ H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	-	**** T _{mapp} at pH 7.0 = 58 °C	-	[77]
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	-	-	-	**** T _{mapp} at pH 6.0 = 58 °C	-	
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Myceliophthora thermophila</i>	MfPMO9J	<i>Aspergillus nidulans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	**** T _{mapp} at pH 7.0 = 69 °C	-	[78]
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			TfLPMO9A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Notations: (S) fixed concentration; (*) k_{cat}/K_M calculated for this paper considering the molecular weight of 24.2 kDa for TfLPMO9E; (**) this enzyme has no name yet, the provided code is its coding gene; (***) pH stability not correlated with analyzed pH values; (****) apparent midpoint transition temperatures (T_{mapp}) calculated on the basis of CD (MfLPMO9D and TfLPMO9A) and intrinsic Trp fluorescence emission (ITFE) (MfLPMO9J) analysis; (#) k_{cat} estimated based on previous k_{cat}/K_M and K_M values for MfPMO9E. Kinetic studies were conducted at ^(a) pH = 6.0 and ^(b) pH = 9.0. Abbreviations: PWS—Pretreated wheat straw; CNW—Chitin nanowhisker. For more details, see the corresponding references.

2.4. Substrate Specificity and Kinetic Parameters

AfCel6A exhibited broad substrate specificity, including CM-Cellulose, Avicel®, xyloglucan, and birchwood xylan. This enzyme displayed higher specific activities toward CM-Cellulose ($36.6 \pm 2.1 \text{ U mg}^{-1}$) and Avicel® ($35.8 \pm 2.6 \text{ U mg}^{-1}$) than birchwood xylan ($21.1 \pm 0.1 \text{ U mg}^{-1}$) and xyloglucan ($19.9 \pm 0.3 \text{ U mg}^{-1}$) (Figure 5). When CMC was the substrate, purified *AfCel6A* had K_M , V_{max} , and k_{cat}/K_M of $7.44 \pm 0.51 \text{ g L}^{-1}$, $195.2 \pm 4.65 \text{ U mg}^{-1}$, and $19.9 \text{ mL mg}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively (Table 2).

Figure 5. *AfCel6A* specific activity (U mg^{-1}) toward CM-Cellulose, Avicel, xyloglucan, and xylan. Each reaction was performed in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.5% (*w/v*) of each substrate at 55 °C for 30 min. Values are the mean $\pm$ SD of three replicates.

We evaluated recombinant *AfAA9_B* peroxidase activity toward the chromogenic substrate 2,6-DMP and the co-substrate H_2O_2 , according to Breslmayr et al. (2018) [80], with some modifications. Table 3 summarizes the kinetic parameters determined when the reactions were carried out at pH 6.0 or 9.0 and 50 °C.

The V_{max} values were higher at pH 9.0 for both the substrate ($1481 \pm 72.19 \text{ U g}^{-1}$) and the co-substrate ($972.5 \pm 28.31 \text{ U g}^{-1}$). Since we performed the saccharification tests at pH 6.0, we also determined the kinetic parameters under these conditions. At this pH, V_{max} was $78.52 \pm 3.33 \text{ U g}^{-1}$ for the substrate and $49.26 \pm 4.48 \text{ U g}^{-1}$ for the co-substrate. These results were expected because pH 9.0 was optimal for *AfAA9_B* activity.

Compared to the kinetic parameters described for other LPMOs, *AfAA9_B* had lower K_{Mapp} ($0.79 \mu\text{M}$) than PMO9D_SCYTH (0.51 mM), PMO9D_SCYTH (0.51 mM), and PMO9D_MALCI (1.17 mM), which showed that *AfAA9_B* had higher binding affinity for 2,6-DMP (Table 3).

2.5. Effect of Different Metal Ions and Chemicals

Cellobiohydrolases are commonly used in many industrial processes. The effects of additives and products of cellulose hydrolysis on the activity of these enzymes must be considered during operation on an industrial scale.

Table 4 depicts how different ions and reagents influence CM-Cellulose hydrolysis by purified *AfCel6A*. At 5 mM, MnCl_2 ($189.25 \pm 2.33\%$), DTT ($150.68 \pm 5.29\%$), CoCl_2 ($116.75 \pm 1.36\%$), FeSO_4 ($125.83 \pm 3.61\%$), β -mercaptoethanol ($134.24 \pm 1.02\%$), AgNO_3 ($179.27 \pm 20.04\%$), and ascorbic acid ($121.40 \pm 2.55\%$) stimulated *AfCel6A* activity. EDTA, DMSO, SLS, Triton X-100, Tween 20, CaCl_2 , MgSO_4 , KCl, and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ practically did

not affect *AfCel6A* activity. On the other hand, SDS inhibited the enzyme by approximately 50%. The fact that β -mercaptoethanol and DTT boosted *AfCel6A* activity by 134.64% and 150.68%, respectively, suggested that the presence of sulfhydryl groups such as the ones from cysteine residues in the active site is important for enzymatic catalysis [81].

Table 4. Effects of additives on *AfCel6A* and *AfAA9_B* activity.

Additive	<i>AfAA9_B</i>	<i>AfCel6A</i>
	% Relative Activity	
None	100.0 $\pm$ 1.0	100.0 $\pm$ 0.9
SDS	107.8 $\pm$ 4.8	53.72 $\pm$ 0.31
Tween 20	103.7 $\pm$ 9.6	93.24 $\pm$ 2.11
EDTA	0	91.88 $\pm$ 1.56
Ascorbic Acid	-	121.40 $\pm$ 2.55
DMSO	108.3 $\pm$ 1.5	101.03 $\pm$ 3.58
β -mercaptoethanol	36.7 $\pm$ 0.6	134.24 $\pm$ 1.02
ZnSO ₄	36.8 $\pm$ 6.1	83.67 $\pm$ 0.65
MnCl ₂	82.2 $\pm$ 0.7	189.25 $\pm$ 2.33
CoCl ₂	0	116.75 $\pm$ 1.36
CaCl ₂	93.6 $\pm$ 3.3	101.1 $\pm$ 2.4
FeSO ₄	0	125.83 $\pm$ 3.61
MgSO ₄	113.9 $\pm$ 1.9	95.92 $\pm$ 2.13
CuSO ₄	35.2 $\pm$ 4.6	85.08 $\pm$ 0.65
AgNO ₃	0	179.27 $\pm$ 20.04
KCl	107.5 $\pm$ 2.1	98.87 $\pm$ 2.44
(NH ₄) ₂ SO ₄	88.9 $\pm$ 3.2	99.9 $\pm$ 2.1
DTT	0	150.68 $\pm$ 5.29
Triton X-100	84.8 $\pm$ 2.3	91.55 $\pm$ 1.19
SLS	115.3 $\pm$ 0.7	93.80 $\pm$ 1.60

As for *AfAA9_B*, SLS (115.3 $\pm$ 0.7%), SDS (107.8 $\pm$ 4.8%), Tween 20 (103.7 $\pm$ 9.6%), DMSO (108.3 $\pm$ 1.5%), MgSO₄ (113.9 $\pm$ 1.9%), and KCl (107.5 $\pm$ 2.1%) did not inhibit this enzyme. DTT, EDTA, CoCl₂, FeSO₄, and AgNO₃ completely inhibited *AfAA9_B*. β -mercaptoethanol, ZnSO₄, and CuSO₄ decreased *AfAA9_B* activity by 70%. MnCl₂, CaCl₂, and (NH₄)₂SO₄ affected *AfAA9_B* little.

We described that cellobiohydrolases act on short cellulose molecules and cellobiosaccharides, releasing disaccharide units, such as cellobiose [35]. Cellobiose is the major product of cellulose hydrolysis by cellobiohydrolases, whereas glucose is the final product of cellulose hydrolysis.

Product inhibition can affect lignocellulosic hydrolysis to glucose and represents a barrier to achieving the high product yields that are necessary for an efficient process [82].

We examined how different glucose (10–250 mM) and cellobiose (10–100 mM) concentrations affected *AfCel6A* activity (Figure 6a). Glucose at 100 and 250 mM inhibited the enzymatic activity by 12% and 13%, respectively. Cellobiose (100 mM) inhibited *AfCel6A* activity by 50%. Cellobiohydrolase from *T. reesei* (*Cel6A*) has been described as the most efficient cellobiohydrolase, with IC₅₀ of 240 mM for glucose and 20 mM for cellobiose [58]. Therefore, our results showed that *AfCel6A* was more resistant to inhibition by both products because IC₅₀ was higher than 250 mM for glucose and 100 mM for cellobiose.

Likewise, we investigated how both sugars affected *AfAA9_B* activity (Figure 6b). Surprisingly, the enzyme retained more than 80% of its initial activity when we added 250 mM glucose or 100 mM cellobiose to the reaction. Together, these findings indicated that *AfCel6A* and *AfAA9_B* have potential application in enzymatic cellulose saccharification. However, to improve the efficiency of these enzymes and to increase glucose production, synergistic association with other enzymes is required.

Figure 6. ● Glucose and ■ cellobiose effects on (a) *AfCel6A* and (b) *AfAA9_B* activity.

2.6. Synergistic Action on Cellulose Hydrolysis

To determine the synergistic effects of *AfCel6A* and *AfAA9_B*, we performed cellulose degradation experiments by using CMC as substrate. We conducted the reactions at different relative proportions and for different incubation times. Surprisingly, we observed no synergistic effect between *AfCel6A* and *AfAA9_B* (Figure 7a).

Figure 7. Synergistic action on 1% (*w/v*) CM-Cellulose of (a) *AfCel6A* and *AfAA9_B*; (b) *AfCel6A*, or *AfAA9_B*, or both with Celluclast® 1.5 L cocktail; and (c) *AfCel6A*, or *AfAA9_B*, or both with *Af-EGL7*. All reactions were incubated in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) at 1000 rpm and 50 °C for 4, 8, or 24 h. At the end of each reaction, the measured reducing sugars were plotted as a function of the relative proportions among the added enzymes. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control system (*AfCel6A*, *Af-EGL7*, or cocktail alone).

We also investigated the synergistic effects between *AfCel6A* and *AfAA9_B* and Celluclast® 1.5L at different incubation times. Hydrolysis increased over time, and the yield of reducing sugars peaked after 24 h. Compared to the cocktail alone, *AfAA9_B* or *AfCel6A* addition to the reaction mixture containing Celluclast® 1.5L increased the release of reducing sugars by approximately 3.5 and 4.0 times, respectively. When Celluclast® 1.5L cocktail was simultaneously associated with *AfCel6A* and *AfAA9_B* at a ratio of 1:1:10, the maximum release of reducing sugars was 4.5 times higher compared to the cocktail alone. We verified a slight synergistic degree for Celluclast® 1.5L cocktail, *AfCel6A*, and *AfAA9_B* during CM-Cellulose hydrolysis. No inhibitory effect arose, probably

because *AfAA9_B* acted synergistically with other enzymes in Celluclast® 1.5L cocktail (Figure 7b).

LPMOs improve the efficiency of cellulase; i.e., endoglucanases and cellobiohydrolases, during cellulose hydrolysis, and they enhance cellulase adsorption and accessibility to cellulose [83,84]. We analyzed *AfAA9_B* and *AfCel6A* synergism with endoglucanase *Af-EGL7*, which had been previously characterized [32]. Compared to *Af-EGL7* alone, combination of *Af-EGL7* and *AfAA9_B* released eight-fold more reducing sugars, whilst combination of *Af-EGL7* and *AfCel6A* increased hydrolyses by 11.5 times. When the three enzymes were associated at an *Af-EGL7*/*AfAA9_B*/*AfCel6A* ratio of 1:10:10, 12.5 times more reducing sugars was released (Figure 7c). Thus, *AfAA9_B* acted synergistically with *Af-EGL7*, but not with *AfCel6A*.

The efficiency of synergy among enzymes depends on the relative amount of crystalline to amorphous cellulose that is accessible within the substrate [85]. To evaluate how these enzymes acted on lignocellulosic biomass, we analyzed the associations of the enzymes in complex biomass, including SEB, rice straw, and corncob. SEB and corncob hydrolysis depended on time, but reducing sugars released from rice straw did not increase when we changed the reaction time from 24 to 48 h. Bernardi et al. (2019) [32] observed the same profile when they accomplished rice straw hydrolysis by a cocktail under similar conditions.

As shown in Figure 8a, compared to Celluclast® 1.5L cocktail alone, *AfCel6A* or *AfAA9_B* addition increased SEB hydrolysis by ~70% and ~95% after 24 and 48 h, respectively. Similarly, association between commercial cellulases and *AfCel6A* boosted corncob hydrolysis by ~90% and ~70% after 24 and 48 h, respectively. On the other hand, *AfAA9_B* addition seemed to affect hydrolysis negatively (Figure 8b). The same inhibitory effect of LPMOs has been observed on rice straw, while *AfCel6A* addition almost did not impact the release of reducing sugars (Figure 8c). The divergent results among the three agricultural residues pointed to the substrate-dependence and substrate specificity of *AfCel6A* and *AfAA9_B* synergism with cellulases [86].

Figure 8. Effect of Celluclast® 1.5L cocktail supplementation with *AfCel6A* or *AfAA9_B* on hydrolysis of (a) SEB, (b) corncob, and (c) rice straw. All reactions were incubated in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% (*w/v*) of each biomass at 1000 rpm and 50 °C for 24 and 48 h. At the end of each reaction, the measured reducing sugars was plotted as a function of the relative proportions between the recombinant enzymes and commercial cellulases. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation to the cocktail alone.

Compared to *Af*-EGL7 alone, the association between *Af*-EGL7 and *Af*Cel6A increased the amount of reducing sugars released from the three biomasses: ~163%, ~118%, and ~88% for SEB (Figure 9a), corncob (Figure 9b), and rice straw (Figure 9c), respectively, after 48 h. The *Af*-EGL7 *Af*AA9_B combination also improved SEB and corncob hydrolysis, but it did not affect rice straw degradation.

Figure 9. Combined activities of *Af*-EGL7 and *Af*Cel6A or *Af*AA9_B on the hydrolysis of (a) SEB; (b) corncob; and (c) rice straw. All reactions were incubated in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% (*w/v*) of each biomass for 24 and 48 h at 50 °C and 1000 rpm. At the end of each reaction, the measured reducing sugars were plotted in function of the relative proportions between the recombinant enzymes. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation to the *Af*-EGL7 alone.

3. Materials and Methods

3.1. Strains, Culture Conditions, and Vectors

Mycelia of *Aspergillus fumigatus* Af293 (kindly donated by Professor Sérgio Akira Uyemura—University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil) were obtained for RNA extraction. Fresh conidia (2×10^6 per mL) were inoculated in YNB minimal medium ($1 \times$ salt solution, 0.1% (*v/v*) trace elements, and 0.05% (*w/v*) yeast extract) containing 1% (*w/v*) fructose and incubated under shaking at 200 rpm and 37 °C for 16 h. The mycelia were harvested, washed, and transferred to YNB medium containing 1% (*w/v*) sugarcane exploded bagasse (SEB) at 200 rpm and 37 °C for 24 h.

E. coli DH10 β was used to clone and to propagate the recombinant vectors. The strain was kept in Luria–Bertani medium supplemented with the appropriate antibiotic.

Pichia pastoris strain X-33 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to produce the heterologous proteins. The employed growth conditions are described in the EasySelect™ *Pichia* Expression Kit manual (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The plasmids pPICZB and pPICZ α A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used to clone, to sequence, and to express *Af*AA9_B and *Af*Cel6A, respectively.

Xyloglucan from tamarind seed and xylan from beechwood were acquired from Megazyme (Megazyme International, Bray, Co., Wicklow, Ireland). Avicel® PH-101 and low-viscosity CM-Cellulose (CMC) were purchased from Sigma (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Biomasses (rice straw and corncob) were provided by Professor Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil). Sugarcane

exploded bagasse (SEB) was provided by Professor João Atílio Jorge (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil).

3.2. RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Gene Amplification

Total RNA from *A. fumigatus* mycelia was isolated by using the Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA); the manufacturer's instructions were followed. cDNA was synthesized by using SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Table 5 describes the specific primer sequences obtained for *AfAA9_B* and *AfCel6A* amplification and cloning into the vectors pPICZB and pPICZαA, respectively:

Table 5. Primer sequences used to amplify and to clone genes.

Primer Name	Sequence (5'-3')
<i>AfAA9_B</i> Fw	CAAAAAACA CTAATTATTCGAAACGAGGAATTCATGACTTTGTCCAAGATCAC
<i>AfAA9_B</i> Rv	CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTGTTCTAGAGCGTTGAACAGTGCAGGAC
<i>AfCel6A</i> Fw	GAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTC CAGCAGACCGTATGG
<i>AfCel6A</i> Rv	ATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTGTTCTAGAAAGGACGGGTTAGC

Notation: The overlapping regions between the vector and the insert are in bold.

The amplification reactions were performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the PCR product was analyzed by electrophoresis and purified from 1% (*w/v*) agarose gel by using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany).

3.3. Enzyme Production and Purification

AfAA9_B and *AfCel6A* ORFs (open reading frames) with and without predicted signal peptides, respectively, were cloned into the corresponding vectors pPICZB and pPICZαA (previously digested with the restriction enzymes *EcoRI* and *XbaI*) by the circular polymerase extension cloning (CPEC) method [87]. Both CPEC reactions were carried out with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). The thermocycling conditions were as follows: 98 °C for 30 s; 35 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min 30 s; and 72 °C for 10 min. The cloning products were transformed to *E. coli* DH10β, and the resistant transformants were selected with zeocin (50 µg mL⁻¹). Next, the recombinant vectors pPICZB/*AfAA9_B* and pPICZαA/*AfCel6A* were linearized with *PmeI* and transformed into competent *P. pastoris* X-33 cells by electroporation according to the EasySelect™ Pichia Expression Kit manual (Invitrogen).

Zeocin-resistant *P. pastoris* transformants were selected to produce the enzymes. The recombinant yeasts were cultivated in buffered glycerol-complex medium (BMGY) at 240 rpm and 30 °C. For heterologous *AfAA9_B* expression, *P. pastoris* cells were resuspended in buffered methanol-complex medium (BMMY). Methanol (1% (*v/v*)) was added to the medium at 24-h intervals for six days, and the supernatant was harvested from the grown culture. The supernatant containing secreted recombinant enzyme (*AfAA9_B*) was concentrated 10 times by using an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter—10-kDa cutoff (Millipore, Burlington, MA, USA). Protein expression was verified by SDS-PAGE.

AfCel6A was expressed as described above, but 1.5% (*v/v*) methanol was added.

To purify the enzymes, the concentrates were resuspended in 20 mM sodium phosphate buffer containing 500 mM NaCl (pH 7.4) and loaded onto Ni²⁺ Sepharose 6 Fast Flow resin (Ge Healthcare, Little Chalfont, UK). An imidazole gradient from 0 to 500 mM was applied to the columns to elute the recombinants His6-tagged *AfAA9_B* and His6-tagged *AfCel6A*. The fractions were collected, and the enzymes were analyzed by 10% (*w/v*) SDS-PAGE, stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fractions containing the recombinant enzymes were mixed and buffer-exchanged by using an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter—10 kDa cutoff (Millipore) to remove excess imidazole.

To coordinate copper to the AfAA9_B active site, the purified recombinant enzyme was incubated with CuSO₄ at 1:3 molar ratio and 4 °C for 30 min. Then, the AfAA9_B solution was dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer containing 500 mM NaCl (pH 7.4) under shaking at 4 °C for 48 h, to remove traces of non-coordinated Cu²⁺. The purified AfAA9_B concentration was determined by the Greenberg method [88].

The AfAA9_B band from the SDS-PAGE gel was manually excised, reduced, alkylated, digested with trypsin, purified (Promega, Madison, WI, EUA—V5111), and analyzed by mass spectrometry according to a previously described method [89].

3.4. Glycosylation

N-glycosylation sites were predicted by employing NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), and O-glycosylation was analyzed by using NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). Deglycosylation of recombinant AfAA9_B and AfCel6A was accomplished by using Endoglycosidase H (Endo H, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) in non-denaturing conditions, as per the manufacturer's procedure. The resulting enzymes were further analyzed by SDS-PAGE.

3.5. Structural Analysis by Circular Dichroism (CD)

Circular dichroism (CD) spectra of the enzymes were obtained between 190 and 250 nm (far-UV) on a JASCO-810 spectropolarimeter; quartz cuvettes with optical path of 0.1 cm were employed. AfAA9_B (0.021 mg mL^{−1}) and AfCel6A (0.0026 mg mL^{−1}) were diluted in 20 mM sodium phosphate (pH 7.4), and the readings were performed in quadruplicate at scanning speed, band width, and D.I.T. of 50 nm min^{−1}, 3 nm, and 1 s, respectively. All the spectra were corrected for the buffer contributions and converted from millidegrees (mdeg) to Δε in M^{−1} cm^{−1} according to the following equation: $\Delta\epsilon = \theta [(0.1 \cdot \text{MRW}) / (d \cdot c \cdot 3298)]$, where θ is the ellipticity value originally given by equipment (millidegrees), MRW is the enzyme mean residual weight, d is the optical path (cm), and c is the enzyme concentration (mg mL^{−1}). All the secondary structures of the enzymes were predicted by using the BeStSel web server [53], and the results were compared with structures modeled on the Phyre2 [55] and Discovery Studio [90] web servers.

3.6. LPMO Activity Assay

Purified AfAA9_B activity was analyzed as reported by Breslmayr et al. (2018) [80]. The assay consisted of a reaction mixture containing 1 mM 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 μM H₂O₂, and recombinant purified AfAA9_B in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0). For the blank, the enzyme was denatured by incubation at 99 °C for 30 min before the reaction mixture was added. After 5 min at 30 °C, absorbance was read at 469 nm to calculate the LPMO peroxidase activity.

3.7. AfCel6A Activity Assay

AfCel6A activity was determined by measuring reducing sugars from the reaction by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [91]. Briefly, the reaction mixture consisting of 1% CM-Cellulose (*w/v*) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) was incubated at 55 °C for 30–45 min. The enzymatic action was stopped by adding an equal volume of the DNS reagent. The mixture was boiled for 5 min and cooled, and absorbance was measured at 540 nm. One unit of AfCel6A was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol of reducing sugar from the substrate per minute. Each assay was carried out in triplicate. Enzyme concentration was determined by the Greenberg method [88].

3.8. Enzymatic Properties of AfAA9_B and AfCel6A

The optimal pH for AfAA9_B activity was measured at pH ranging from 4.0 to 8.0 in McIlvaine buffer (citric acid-Na₂HPO₄) and at pH 9.0 and 10.0 in 100 mM Glycine-NaOH buffer at 30 °C. The relative activity was calculated with respect to the maximum activity of 100%; the aforementioned method was followed. The pH stability was estimated

by measuring the residual enzymatic activity after the enzyme was incubated without substrate in the aforementioned buffers at pH ranging from 3.0 to 10.0 and 4 °C for up to 72 h. To determine the AfAA9_B thermal stability, the enzyme was preincubated without substrate at 50 and 60 °C for up to 72 h. To measure the residual activity, the enzymatic activity without preincubation was considered 100%.

The optimal pH for AfCel6A activity was measured from 3.0 to 8.0 in McIlvaine buffer (citric acid- Na_2HPO_4) at 55 °C. The optimal temperature was examined between 40 and 80 °C. The relative activity was calculated with respect to the maximum exhibited activity of 100%; the aforementioned method was followed.

The AfCel6A pH stability was estimated by measuring the residual enzymatic activity under standard conditions after the enzyme was incubated without substrate in McIlvaine (citrate-phosphate) buffers pH 3.0–8.0 and in 100 mM Glycine-NaOH buffers pH 9.0 and 10.0 at 4 °C for up to 72 h. To determine the AfCel6A thermal stability, the enzyme was preincubated without substrate at temperatures ranging from 50 to 90 °C for different times. To measure the residual activity, the enzymatic activity without preincubation was considered 100%.

3.9. Effect of Additives

How various metal ions affected AfAA9_B and AfCel6A was determined by adding Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , NH_4^+ , K^+ , or Ag^+ at a final concentration of 5 mM to the reaction mixture. The effects of EDTA, SDS, Tween 20, Triton X-100, SLS, β -mercaptoethanol, DTT, and DMSO were also tested. For AfCel6A, the effect of ascorbic acid addition was also evaluated. Control reactions (100% activity) were performed without any additive. The relative activity was estimated as compared to the controls.

3.10. Glucose and Cellobiose Effects on AfCel6A and AfAA9_B Activity

The glucose (10–250 mM) and cellobiose (up to 100 mM) effects on the activity of AfAA9_B and AfCel6A were determined in the presence of increasing concentrations of both sugars by using the chromogenic substrates 2,6-DMP and 4-nitrophenyl β -D-cellobioside (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectively.

3.11. Kinetic Assays

The AfAA9_B kinetic parameters (K_M , $V_{\max}$, and k_{cat}) were determined for the substrate 2,6-DMP (0.1 to 10 mM) and the co-substrate H_2O_2 (1 to 500 μM). The reactions were performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) and 100 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0) at 50 °C. The parameters were calculated by Michaelis-Menten nonlinear regression.

The AfCel6A kinetic parameters were determined when CM-Cellulose (0.5–30 mg mL^{-1}) was used as substrate. The reactions were performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) as previously described. The parameters were calculated by the Michaelis-Menten nonlinear regression graphical method.

3.12. Combined Assays

AfAA9_B and AfCel6A enzymatic assays were carried out concomitantly with the recombinant endoglucanase Af-EGL7 as previously described [32]. The assays were performed by adding 1 μg of Af-EGL7 to 50 μg of AfAA9_B (1:50) or 10 μg of AfCel6A (1:10) per gram of substrate. The reaction mixtures consisted of CM-Cellulose (1% (w/v)) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1 mM ascorbic acid in a final volume of 1 mL. The reactions were performed in a thermomixer (Eppendorf) at 50 °C and 1000 rpm for 4, 8, or 24 h.

In the same way, AfAA9_B and AfCel6A were combined at different concentration proportions (10:1, 1:1, 10:10, or 1:10), where the minimum and maximum enzyme loading corresponded to 5 and 50 μg of added enzyme per gram of CM-Cellulose, respectively.

Finally, the effect of the simultaneous association of the three recombinant enzymes on the degradation of CM-Cellulose was evaluated. While the Af-EGL7 concentration was

1 $\mu\text{g g}^{-1}$, the concentrations of both *AfAA9_B* and *AfCel6A* were 10 μg per gram of CM-Cellulose, generating the ratio 1:10:10. The reactions were carried out as described above.

The degradation efficiencies were assessed by estimating the released reducing sugars by the DNS method. The reported results represent the mean $\pm$ SD calculated from at least three experimental replicates.

3.13. Synergistic Activity with Celluclast® 1.5L

AfAA9_B and *AfCel6A* synergistic activity of during enzymatic hydrolysis was investigated in combination with Celluclast® 1.5L, a commercial cellulase cocktail from *Trichoderma reesei*.

To this end, 0.05 FPU of Celluclast® 1.5L cocktail was associated with 50 μg of *AfAA9_B* (ratio 1:10) or 5 μg of *AfCel6A* (ratio 1:1) per gram of CM-Cellulose (1% (*w/v*)) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1 mM ascorbic acid. The reactions were conducted at 1000 rpm and 50 °C for up to 24 h in a final volume of 1 mL.

The effect of the simultaneous association between commercial cellulases and the two recombinant enzymes from *A. fumigatus* on the degradation of CM-Cellulose was also evaluated. While the Celluclast® 1.5 L cocktail loading was fixed at 0.05 FPU g^{-1} , the *AfCel6A* and *AfAA9_B* concentrations were 5 and 0.5 μg of enzyme added per gram of CM-Cellulose, respectively. The reactions were carried out as described above.

The percent hydrolysis yields were determined by estimating the released reducing sugars by the DNS method [91]. The reported results represent the mean $\pm$ SD calculated from at least three experimental replicates.

3.14. Lignocellulosic Biomass Saccharification

Enzymatic hydrolyses of some agro-industrial residues were carried out as described by Bernardi et al. (2019) with some modifications [32]. Saccharification was accomplished in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% (*w/v*) of one of the following biomasses: SEB (sugarcane exploded bagasse), rice straw, or corncob.

Different associations between the enzymes were used during biomass saccharifications. *Af-EGL7* (18 $\mu\text{g g}^{-1}$) was combined with *AfAA9_B* (900 $\mu\text{g g}^{-1}$) or *AfCel6A* (180 $\mu\text{g g}^{-1}$). Similarly, a fixed concentration of Celluclast 1.5L cocktail (0.9 FPU g^{-1}) was associated with *AfAA9_B* (900 $\mu\text{g g}^{-1}$) or *AfCel6A* (90 $\mu\text{g g}^{-1}$). The reactions were conducted at 1000 rpm and 50 °C for up to 48 h in a final volume of 1 mL. DNS was added to stop the reactions and to measure the released reducing sugars. The reported results represent the mean $\pm$ SD calculated from at least three experimental replicates.

3.15. Reproducibility of the Results

All the data are the mean of at least three independent experiments and show consistent results.

4. Conclusions

Novel cellobiohydrolase and LPMO from *Aspergillus fumigatus* were characterized after they were expressed in *P. pastoris*. Supplementation of a cellulase cocktail with both enzymes improved the yield of saccharification of different biomasses, especially SEB. However, *AfAA9_B* did not have a positive effect on *AfCel6A* activity. On the other hand, *AfAA9_B* acted synergistically with endoglucanase *Af-EGL7*. These different synergistic effects are important to understand the action of LPMOs with cellulases and would help to design new commercial enzymatic cocktails. Considering the reduction of costs in lignocellulose conversion, we can conclude that supplementation of Celluclast® 1.5L with *AfCel6A* or *AfAA9_B* suffices to increase the hydrolytic activity, so the composition of cellulase cocktails may need to be reconsidered.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/276/s1>, Table S1: Secondary structure proportions of *AfAA9_B* and *AfCel6A* from

literature and different prediction methods in comparison with the one determined by BeStSel based on the CD spectra.

Author Contributions: Conceptualization: A.V.B., L.E.G. and T.M.D.; data curation: A.V.B., L.E.G., P.F.d.G., L.M.S.P. and D.K.Y.; formal analysis: A.V.B., L.E.G., P.F.d.G., L.M.S.P. and D.K.Y.; methodology: A.V.B., L.E.G., P.F.d.G., L.M.S.P. and D.K.Y.; supervision: A.H.C.d.O., S.A.U. and T.M.D.; writing (original draft): A.V.B. and T.M.D.; writing (review and editing): A.V.B., A.H.C.d.O., S.A.U. and T.M.D.; project administration: T.M.D.; funding acquisition: T.M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2016/190950-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 425465/2016-0). AVB was funded by a scholarship granted by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), Finance Code 001. DKY was funded by a scholarship granted by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2018/11231-7).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the study design; data collection, analyses, or interpretation; writing of the manuscript; or the decision to publish the results.

Abbreviations

2G ethanol	Second-generation ethanol
LPMO	Lytic Polysaccharide Monooxygenase
AA	Auxiliary Activity
GH	Glycoside Hydrolase
CD	Circular Dichroism
CBM	Carbohydrate Binding Module
CMC-Na	Sodium Carboxymethyl Cellulose
2,6-DMP	2,6-Dimethoxyphenol
PASC	Phosphoric-acid Swollen Cellulose
pNPC	4(<i>p</i>)-nitrophenyl β-D-cellobioside
SEB	Sugarcane Exploded Bagasse
DNS	3,5-Dinitrosalicylic acid
FPU	Filter Paper Unit

References

1. El-Tayeb, T.S.; Abdelhafez, A.A.; Ali, S.H.; Ramadan, E.M. Effect of acid hydrolysis and fungal biotreatment on agro-industrial wastes for obtainment of free sugars for bioethanol production. *Braz. J. Microbiol.* **2012**, *43*, 1523–1535. [PubMed]
2. Anwar, M.; Lou, S.; Chen, L.; Li, H.; Hu, Z. Recent advancement and strategy on bio-hydrogen production from photosynthetic microalgae. *Bioresour. Technol.* **2019**, *292*, 121972. [PubMed]
3. Ren, H.Y.; Kong, F.; Zhao, L.; Ren, N.Q.; Ma, J.; Nan, J.; Liu, B.F. Enhanced co-production of biohydrogen and algal lipids from agricultural biomass residues in long-term operation. *Bioresour. Technol.* **2019**, *289*, 121774.
4. Boboescu, I.-Z.; Damay, J.; Chang, J.K.W.; Beigbeder, J.-B.; Duret, X.; Beauchemin, S.; Lalonde, O.; Lavoie, J.-M. Ethanol production from residual lignocellulosic fibers generated through the steam treatment of whole sorghum biomass. *Bioresour. Technol.* **2019**, *292*, 121975. [PubMed]
5. Dhakate, S.R.; Pathak, A.K.; Jain, P.; Singh, M.; Singh, B.P.; Subhedar, K.M.; Sharda, S.S.; Seth, R.K. Rice straw biomass to high energy yield biocoal by torrefaction: Indian perspective. *Curr. Sci.* **2019**, *116*, 831–838.
6. Hill, J.; Polasky, S.; Nelson, E.; Tilman, D.; Huo, H.; Ludwig, L.; Neumann, J.; Zheng, H.; Bonta, D. Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2077–2082. [PubMed]
7. Mudinoor, A.R.; Goodwin, P.M.; Rao, R.U.; Karuna, N.; Hitomi, A.; Nill, J.; Jeoh, T. Interfacial molecular interactions of cellobiohydrolase Cel7A and its variants on cellulose. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13*, 1–16.
8. Kucharska, K.; Rybarczyk, P.; Hołowacz, I.; Łukajtis, R.; Glinka, M.; Kamiński, M. Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes. *Molecules* **2018**, *23*, 2937.
9. Ravindran, R.; Jaiswal, A.K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* **2016**, *199*, 92–102.

10. Nishiyama, Y. Structure and properties of the cellulose microfibril. *J. Wood Sci.* **2009**, *55*, 241–249.
11. Payne, C.M.; Knott, B.C.; Mayes, H.B.; Hansson, H.; Himmel, M.E.; Sandgren, M.; Ståhlberg, J.; Beckham, G.T. Fungal cellulases. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1308–1448. [[PubMed](#)]
12. Medie, F.M.; Davies, G.J.; Drancourt, M.; Henrissat, B. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 227–234.
13. Blumer-Schuetz, S.E.; Kataeva, I.; Westpheling, J.; Adams, M.W.; Kelly, R.M. Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: Status and prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 210–217. [[PubMed](#)]
14. Hu, J.; Chandra, R.; Arantes, V.; Gourelay, K.; van Dyk, J.S.; Saddler, J.N. The addition of accessory enzymes enhances the hydrolytic performance of cellulase enzymes at high solid loadings. *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 149–153. [[PubMed](#)]
15. 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. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 112. [[PubMed](#)]
16. Müller, G.; Várnai, A.; Johansen, K.S.; Eijsink, V.G.H.; Horn, S.J. Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 1–9.
17. Garcia-Santamarina, S.; Probst, C.; Festa, R.A.; Ding, C.; Smith, A.D.; Conklin, S.E.; Brander, S.; Kinch, L.N.; Grishin, N.V.; Franz, K.J.; et al. A lytic polysaccharide monooxygenase-like protein functions in fungal copper import and meningitis. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16*, 337–344.
18. Vaaje-Kolstad, G.; Horn, S.J.; Van Aalten, D.M.F.; Synstad, B.; Eijsink, V.G.H. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28492–28497.
19. Merino, S.T.; Cherry, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2007**, *108*, 95–120.
20. Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Horn, S.J.; Liu, Z.; Zhai, H.; Sørli, M.; Eijsink, V.G.H. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* **2010**, *330*, 219–222.
21. Frandsen, K.E.H.; Tovborg, M.; Jørgensen, C.I.; Spodsborg, N.; Rosso, M.N.; Hemsworth, G.R.; Garman, E.F.; Grime, G.W.; Poulsen, J.C.N.; Batth, T.S.; et al. Insights into an unusual Auxiliary Activity 9 family member lacking the histidine brace motif of lytic polysaccharide monooxygenases. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 17117–17130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bertini, L.; Breglia, R.; Lambrugh, M.; Fantucci, P.; De Gioia, L.; Borsari, M.; Sola, M.; Bortolotti, C.A.; Bruschi, M. Catalytic Mechanism of Fungal Lytic Polysaccharide Monooxygenases Investigated by First-Principles Calculations. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 86–97. [[CrossRef](#)]
23. Dimarogona, M.; Topakas, E.; Christakopoulos, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2012**, *2*, e201209015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vaaje-Kolstad, G.; Forsberg, Z.; Loose, J.S.; Bissaro, B.; Eijsink, V.G. Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *44*, 67–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hemsworth, G.R.; Henrissat, B.; Davies, G.J.; Walton, P.H. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 122–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Quinlan, R.J.; Sweeney, M.D.; Leggio, L.L.; Otten, H.; Poulsen, J.-C.N.; Johansen, K.S.; Krogh, K.B.R.M.; Jørgensen, C.I.; Tovborg, M.; Anthonsen, A.; et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 15079–15084. [[CrossRef](#)]
27. Eijsink, V.G.H.; Petrovic, D.; Forsberg, Z.; Mekasha, S.; Rohr, Å.K.; Várnai, A.; Bissaro, B.; Vaaje-Kolstad, G. On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 58. [[CrossRef](#)]
28. Bissaro, B.; Rohr, Å.K.; Müller, G.; Chylenski, P.; Skaugen, M.; Forsberg, Z.; Horn, S.J.; Vaaje-Kolstad, G.; Eijsink, V.G.H. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 1123–1128. [[CrossRef](#)]
29. Walton, P.H.; Davies, G.J. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *31*, 195–207. [[CrossRef](#)]
30. Danneels, B.; Tanghe, M.; Desmet, T. Structural Features on the Substrate-Binding Surface of Fungal Lytic Polysaccharide Monooxygenases Determine Their Oxidative Regioselectivity. *Biotechnol. J.* **2019**, *14*, e1800211. [[CrossRef](#)]
31. Eibinger, M.; Ganner, T.; Bubner, P.; Rošker, S.; Kracher, D.; Haltrich, D.; Ludwig, R.; Plank, H.; Nidetzky, B. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 35929–35938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bernardi, A.V.; Yonamine, D.K.; Uyemura, S.A.; Dinamarco, T.M. A Thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 Endoglucanase Over-Expressed in *Pichia pastoris* Stimulates Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2261. [[CrossRef](#)]
33. Paul, S.; Zhang, A.; Ludeña, Y.; Villena, G.K.; Yu, F.; Sherman, D.H.; Gutiérrez-Correa, M. Insights from the genome of a high alkaline cellulase producing *Aspergillus fumigatus* strain obtained from Peruvian Amazon rainforest. *J. Biotechnol.* **2017**, *251*, 53–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Liu, D.; Zhang, R.; Yang, X.; Wu, H.; Xu, D.; Tang, Z.; Shen, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2011**, *65*, 717–725. [[CrossRef](#)]
35. Christensen, S.J.; Bertel, K.; Morkeberg, R.; Spodsborg, N.; Borch, K.; Westh, P. A biochemical comparison of fungal GH6 cellobiohydrolases. *Biochem. J.* **2019**, *6*, 2157–2172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Bernardi, A.V.; De Gouvêa, P.F.; Gerolamo, L.E.; Yonamine, D.K.; De Lourdes, L.; Balico, D.L.; Uyemura, S.A. Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application. *Protein Expr. Purif.* **2018**, *150*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Adsul, M.G.; Gokhale, D.V. The conundrum of making biomass-to-biofuels economic. *Biofuels* **2012**, *3*, 383–386. [\[CrossRef\]](#)
38. Jin, M.; Sousa, L.D.C.; Schwartz, C.; He, Y.; Sarkis, C.; Gunawan, C.; Balan, V.; Dale, B.E. Toward lower cost cellulosic biofuel production using ammonia based pretreatment technologies. *Green Chem.* **2016**, *18*, 957–966. [\[CrossRef\]](#)
39. Chandel, A.K.; Chandrasekhar, G.; Silva, M.B.; Silva, S.D.S. The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32*, 187–202. [\[CrossRef\]](#)
40. Puri, D.J.; Heaven, S.; Banks, C.J. Improving the performance of enzymes in hydrolysis of high solids paper pulp derived from MSW. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 107. [\[CrossRef\]](#)
41. Adsul, M.; Sandhu, S.K.; Singhanian, R.R.; Gupta, R.; Puri, S.K. Enzyme and Microbial Technology Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. *Enzyme Microb. Technol.* **2020**, *133*, 109442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Brooks, D.; Tchelet, R. Next Generation Enzymes. *Biofuels Int.* **2014**, *12*, 49–50.
43. De Gouvêa, P.F.; Gerolamo, L.E.; Bernardi, A.V.; Matheus, L.; Pereira, S.; Uyemura, S.A.; Dinamarco, T.M. Lytic Polysaccharide Monoxygenase from *Aspergillus fumigatus* can Improve Enzymatic Cocktail Activity During Sugarcane Bagasse Hydrolysis. *Protein Pept. Lett.* **2019**, *126*, 377–385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Rubio, M.V.; Zubietta, M.P.; Cairo, J.P.L.F.; Calzado, F.; Leme, A.F.P.; Squina, F.M.; Prade, R.A.; Damásio, A.R.D.L. Mapping N-linked glycosylation of carbohydrate-active enzymes in the secretome of *Aspergillus nidulans* grown on lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 1–19. [\[CrossRef\]](#)
45. Bissaro, B.; Kommedal, E.; Røhr, Å.K.; Eijsink, V.G.H. Controlled depolymerization of cellulose by light-driven lytic polysaccharide oxygenases. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
46. Chylenski, P.; Petrović, D.M.; Müller, G.; Dahlström, M.; Bengtsson, O.; Lersch, M.; Siika-Aho, M.; Horn, S.J.; Eijsink, V.G.H. Enzymatic degradation of sulfite-pulped softwoods and the role of LPMOs. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
47. Courtade, G.; Wimmer, R.; Røhr, Å.K.; Preims, M.; Felice, A.K.G.; Dimarogona, M.; Vaaje-Kolstad, G.; Sørle, M.; Sandgren, M.; Ludwig, R.; et al. Interactions of a fungal lytic polysaccharide monoxygenase with β -glucan substrates and cellobiose dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5922–5927. [\[CrossRef\]](#)
48. Dodda, S.R.; Sarkar, N.; Aikat, K.; Krishnaraj, N.R.; Bhattacharjee, S.; Bagchi, A.; Mukhopadhyay, S. Insights from the Molecular Dynamics Simulation of Cellobiohydrolase Cel6A Molecular Structural Model from *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2016**, *19*, 325–333. [\[CrossRef\]](#)
49. Thompson, A.J.; Heu, T.; Shaghasi, T.; Jones, A.; Friis, E.P.; Wilson, K.S.; Davies, G.J. research papers Structure of the catalytic core module of the *Chaetomium thermophilum* family GH6 cellobiohydrolase Cel6A. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 875–882. [\[CrossRef\]](#)
50. Mertz, B.; Kuczenski, R.S.; Larsen, R.T.; Hill, A.D.; Reilly, P.J. Phylogenetic Analysis of Family 6 Glycoside Hydrolases. *Biopolymers* **2005**, *79*, 197–206. [\[CrossRef\]](#)
51. Sonnhammer, E.L.L.; Eddy, S.R.; Durbin, R. Pfam: A comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1997**, *28*, 405–420. [\[CrossRef\]](#)
52. Kelly, S.M.; Jess, T.J.; Price, N.C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Proteins Proteom.* **2005**, *1751*, 119–139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Micsonai, A.; Wien, F.; Bulyáki, É.; Kun, J.; Moussong, É.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W315–W322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Lo Leggio, L.; Weihe, C.D.; Poulsen, J.C.N.; Sweeney, M.; Rasmussen, F.; Lin, J.; De Maria, L.; Wogulis, M. Structure of a lytic polysaccharide monoxygenase from *Aspergillus fumigatus* and an engineered thermostable variant. *Carbohydr. Res.* **2018**, *469*, 55–59. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Wallace, B.A.; Janes, R.W. *Modern Techniques for Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy*; IOS Press: Amsterdam, NY, USA, 2009; Volume 1, ISBN 9781607500001.
57. Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577–2637. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Teugjas, H.; Välgamäe, P. Product inhibition of cellulases studied with ^{14}C -labeled cellulose substrates. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
59. Fuelbiol, F.; Bai, R.; Yang, H.; Wang, F.; He, J.; Wang, C.; Tu, M. Enzyme and Microbial Technology Heterologous expression of codon optimized *Trichoderma reesei* Cel6A in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *92*, 107–116.
60. Boonvitthya, N.; Bozonnet, S. Comparison of the Heterologous Expression of *Trichoderma reesei* Endoglucanase II and Cellobiohydrolase II in the Yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Biotechnol.* **2013**, *54*, 158–169. [\[CrossRef\]](#)

61. Okada, H.; Sekiya, T.; Yokoyama, K.; Tohda, H.; Kumagai, H.; Morikawa, Y. Efficient secretion of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of its products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 301–308. [\[CrossRef\]](#)
62. Takahashi, M.; Takahashi, H.; Nakano, Y.; Konishi, T.; Terauchi, R.; Takeda, T. Characterization of a Cellobiohydrolase (MoCel6A) Produced by *Magnaporthe oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6583–6590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Riyadh, S.K.; Vipin, I.A.I.K.; Kalia, C.; Lee, J. Characterization of Cellobiohydrolases from *Schizophyllum commune* KMJ820. *Indian J. Microbiol.* **2020**, *60*, 160–166.
64. Limam, F.; Chaabouni, S.E.; Ghir, R.; Marzouki, N. Two cellobiohydrolases of *Penicillium occitanis* mutant Pol 6: Purification and properties. *Enzym. Microb. Technol.* **1995**, *0229*, 340–346. [\[CrossRef\]](#)
65. Tuohy, M.G.; Walsh, D.J.; Murray, P.G.; Claeysens, M.; Cuffe, M.M.; Savage, A.V.; Coughlan, M.P. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Protein Struct. Mol. Enzym.* **2002**, *1596*, 366–380. [\[CrossRef\]](#)
66. Song, J.; Liu, B.; Liu, Z. Cloning of two cellobiohydrolase genes from *Trichoderma viride* and heterogenous expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Rep.* **2010**, *37*, 2135–2140. [\[CrossRef\]](#)
67. Wang, H.; Chen, Y.; Huang, C.; Hseu, R. Cloning and characterization of a thermostable and pH-stable cellobiohydrolase from *Neocallimastix patriciarum* J11. *Protein Expr. Purif.* **2013**, *90*, 153–159. [\[CrossRef\]](#)
68. Toda, H.; Nagahata, N.; Amano, Y.; Nozaki, K.; Kanda, T.; Okazaki, M.; Shimosaka, M. Gene Cloning of Cellobiohydrolase II from the White Rot Fungus *Irpex lacteus* MC-2 and Its Expression in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 3142–3147. [\[CrossRef\]](#)
69. Wang, X.; Peng, Y.; Zhang, L. Directed evolution and structural prediction of cellobiohydrolase II from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 1469–1478. [\[CrossRef\]](#)
70. Agrawal, D.; Basotra, N.; Balan, V.; Tsang, A.; Chadha, B.S. Discovery and Expression of Thermostable LPMOs from Thermophilic Fungi for Producing Efficient Lignocellulolytic Enzyme Cocktails. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2019**, *191*, 463–481. [\[CrossRef\]](#)
71. Keller, M.B.; Felby, C.; Labate, C.A.; Pellegrini, V.O.A.; Higasi, P.; Singh, R.K.; Polikarpov, I.; Blossom, B.M. A simple enzymatic assay for the quantification of C1-specific cellulose oxidation by lytic polysaccharide monooxygenases. *Biotechnol. Lett.* **2020**, *42*, 93–102. [\[CrossRef\]](#)
72. Hangasky, J.A.; Iavarone, A.T.; Marletta, M.A. Reactivity of O₂ versus H₂O₂ with polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 4915–4920. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Forsberg, Z.; Sorlie, M.; Petrović, D.; Courtade, G.; Achmann, F.L.; Vaaje-Kolstad, G.; Bissaro, B.; Rohr, Å.K.; Eijsink, V.G. Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, *59*, 54–64. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Kuusk, S.; Bissaro, B.; Kuusk, P.; Forsberg, Z.; Eijsink, V.G.H.; Sorlie, M.; Valjamae, P. Kinetics of H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 523–531. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Frandsen, K.E.H.; Simmons, T.J.; Dupree, P.; Poulsen, J.C.N.; Hemsworth, G.R.; Ciano, L.; Johnston, E.M.; Tovborg, M.; Johansen, K.S.; Von Freiesleben, P.; et al. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 298–303. [\[CrossRef\]](#)
76. Musaddique, H.; Reddy Dodda, S.; Kapoor, B.S.; Aikat, K.; Mukhopadhyay, S.S. Investigation the biomass conversion efficiency, biochemical characterisation and structural insights of the newly isolated AA16 family of Lytic Polysaccharide Monooxygenase (LPMO) from *Aspergillus fumigatus*. *bioRxiv* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
77. Frommshagen, M.; Westphal, A.H.; Hilgers, R.; Koetsier, M.J.; Hinz, S.W.A.; Visser, J.; Gruppen, H.; van Berkel, W.J.H.; Kabel, M.A. Quantification of the catalytic performance of C1-cellulose-specific lytic polysaccharide monooxygenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 1281–1295. [\[CrossRef\]](#)
78. Kadowaki, M.A.S.; Várnai, A.; Jameson, J.K.; Leite, A.E.T.; Costa-Filho, A.J.; Kumagai, P.S.; Prade, R.A.; Polikarpov, I.; Eijsink, V.G.H. Functional characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0202148. [\[CrossRef\]](#)
79. Singh, R.K.; Blossom, B.M.; Russo, D.A.; Van Oort, B.; Croce, R.; Jensen, P.E.; Felby, C.; Bjerrum, M.J. Thermal unfolding and refolding of a lytic polysaccharide monooxygenase from: *Thermoascus aurantiacus*. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 29734–29742. [\[CrossRef\]](#)
80. Breslmayr, E.; Hanzek, M.; Hanrahan, A.; Leitner, C.; Kittl, R.; Šantek, B.; Oostenbrink, C.; Ludwig, R. A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 79. [\[CrossRef\]](#)
81. Meleiro, L.P.; Carli, S.; Fonseca-Maldonado, R.; Torricillas, M.d.S.; Zimbardi, A.L.R.L.; Ward, R.J.; Jorge, J.A.; Furriel, R.P.M. Overexpression of a Cellobiose-Glucose-Halotolerant Endoglucanase from *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *185*, 316–333. [\[CrossRef\]](#)
82. Atreya, M.E.; Strobel, K.L.; Clark, D.S. Alleviating product inhibition in cellulase enzyme Cel7A. *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 330–338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Kostylev, M.; Wilson, D. A distinct model of synergism between a processive endocellulase (TfCel9A) and an exocellulase (TfCel9A) from *Thermobifida fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 339–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Song, B.; Li, B.; Wang, X.; Shen, W.; Park, S.; Collings, C.; Feng, A.; Smith, S.J.; Walton, J.D.; Ding, S.Y. Real-time imaging reveals that lytic polysaccharide monooxygenase promotes cellulase activity by increasing cellulose accessibility. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

85. Hu, J.; Arantes, V.; Pribowo, A.; Gourlay, K.; Saddler, J.N.; Stephen, J.D.; Mabee, W.E.; Saddler, J.N.; Hu, J.; Arantes, V.; et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy Environ. Sci.* **2014**, *7*, 2308. [[CrossRef](#)]
86. Tokin, R.; Ipsen, J.Ø.; Westh, P.; Johansen, K.S. The synergy between LPMOs and cellulases in enzymatic saccharification of cellulose is both enzyme- and substrate-dependent. *Biotechnol. Lett.* **2020**, *42*, 1975–1984. [[CrossRef](#)]
87. Quan, J.; Tian, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 242–251. [[CrossRef](#)]
88. Greenberg, C.S.; Craddock, P.R. Rapid single-step membrane protein assay. *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 1725–1726. [[CrossRef](#)]
89. Shevchenko, A.; Jensen, O.N.; Podtelejnikov, A.V.; Sagliocco, F.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mortensen, P.; Shevchenko, A.; Boucherie, H.; Mann, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 14440–14445. [[CrossRef](#)]
90. BIOVIA Discovery Studio Visualisation; Accelrys Software Inc.: San Diego, CA, USA, 2017.
91. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–428. [[CrossRef](#)]

Article

A Thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 Endoglucanase Over-Expressed in *Pichia pastoris* Stimulates Lignocellulosic Biomass Hydrolysis

Aline Vianna Bernardi ¹ , Deborah Kimie Yonamine ¹, Sergio Akira Uyemura ² and Taísa Magnani Dinamarco ^{1,*}

¹ Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto, Chemistry Department, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14040-901, Brazil; alinevbernardi@gmail.com (A.V.B.); deborah.yonamine@hotmail.com (D.K.Y.)

² Faculty of Pharmaceutical Science, Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14040-903, Brazil; suyemura@fcfrp.usp.br

* Correspondence: tdinamarco@ffclrp.usp.br; Tel.: +55-16-3315-9121; Fax: +55-16-3315-9101

Received: 2 April 2019; Accepted: 5 May 2019; Published: 7 May 2019

Abstract: In the context of avoiding the use of non-renewable energy sources, employing lignocellulosic biomass for ethanol production remains a challenge. Cellulases play an important role in this scenario: they are some of the most important industrial enzymes that can hydrolyze lignocellulose. This study aims to improve on the characterization of a thermostable *Aspergillus fumigatus* endo-1,4- β -glucanase GH7 (Af-EGL7). To this end, Af-EGL7 was successfully expressed in *Pichia pastoris* X-33. The kinetic parameters K_m and V_{max} were estimated and suggested a robust enzyme. The recombinant protein was highly stable within an extreme pH range (3.0–8.0) and was highly thermostable at 55 °C for 72 h. Low Cu^{2+} concentrations (0.1–1.0 mM) stimulated Af-EGL7 activity up to 117%. Af-EGL7 was tolerant to inhibition by products, such as glucose and cellobiose. Glucose at 50 mM did not inhibit Af-EGL7 activity, whereas 50 mM cellobiose inhibited Af-EGL7 activity by just 35%. Additionally, the Celluclast® 1.5L cocktail supplemented with Af-EGL7 provided improved hydrolysis of sugarcane bagasse “in natura”, sugarcane exploded bagasse (SEB), corncob, rice straw, and bean straw. In conclusion, the novel characterization of Af-EGL7 conducted in this study highlights the extraordinary properties that make Af-EGL7 a promising candidate for industrial applications.

Keywords: Af-EGL7; GH7 endoglucanase; biomass hydrolysis; thermostability

1. Introduction

Raw material processing generates tons of agricultural and industrial waste every year. Unfortunately, biomass accumulation and misuse of such materials cause serious environmental issues. In addition, increased energy consumption, depletion of fossil fuel sources, and the need to abate global warming have drawn special attention to a new generation of renewable energy [1–3]. In this scenario, reusing lignocellulosic residues to synthesize chemical compounds and high-value products like biofuels and other green chemicals has emerged as one of the most potential strategies to overcome environmental problems [2,4].

Lignocellulose consists mainly of cellulose (35–50%), hemicellulose (20–30%), and lignin (20–30%) [5]. Cellulases produced by fungi and bacteria can degrade cellulose [6,7]. In fact, cellulases are considered to be some of the most important industrial enzymes as they can convert cellulose to sugars that can be further fermented to generate bioethanol and biobased products [6,8,9]. The classic mechanism of substrate degradation by cellulases involves the synergistic action of three types of

hydrolytic enzymes: endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolases/exoglucanases (EC 3.2.1.91 and EC 3.2.1.176), and β -glucosidases (EC 3.2.1.21) [8,9].

Endo-1,4- β -glucanases catalyze the initial attack on the cellulose fibrils and randomly cleave the β -1,4-glycosidic bonds present in the amorphous regions of the cellulose chain. The other two cellulases then act to convert the oligosaccharides released from this hydrolysis into glucose [10,11]. According to the carbohydrate-active enzymes (CAZymes) database, endo-1,4- β -glucanases are widespread and are classified into 16 glycosyl hydrolase (GH) families. Enzymes belonging to the GH7 family can act on a broad range of substrates, including cellulose, β -glucan, lichenin, laminarin, and even xylan. This lack of specificity makes the endo-1,4- β -glucanases of this family very attractive for various industrial applications [9].

Because enzymes need to be exposed to extreme conditions during several industrial processes, stability to high temperatures within a wide pH range, as well as tolerance to inhibition by reaction products, are the most desired enzymatic properties at the industrial level [9,12]. Biomass saccharification at elevated temperatures reduces polysaccharides viscosity and bacterial contamination risks and allows enzymes to be directly used after steam pre-treatment, thereby shortening process duration and saving energy [11,13].

Aspergillus fumigatus, a thermophilic fungus, secretes several CAZymes that can be further used in enzymatic cocktails. Therefore, this fungus plays an important role in biomass deconstruction [4,7,14]. In our previous work, we expressed recombinant Af-EGL7 in *E. coli* and characterized its function [4]. Compared to the prokaryotic system, heterologous expression in the methylotrophic yeast *P. pastoris* offers many advantages, especially in terms of recombinant protein processing, folding, and post-translational modifications, which can influence enzyme functioning and even stability [15,16].

This paper reports on the successful gene *Af-egl7* cloning and expression in *P. pastoris* X-33 and on the characterization of the purified Af-EGL7. It shows that a recombinant GH7 endo-1,4- β -glucanase, with higher pH and thermal stabilities, is more active on complex biomasses. Our results highlight the industrial potential of the *A. fumigatus* recombinant endoglucanase Af-EGL7.

2. Results and Discussion

2.1. Af-EGL7 Cloning and Expression

Here, the CPEC method was used to amplify the endo-1,4- β -glucanase ORF (Open reading frame) *Af-egl7* (Afu6g01800) from the *A. fumigatus* cDNA and to clone it into the expression vector pPICZ α A [17]. The recombinant vector pPICZ α A/*Af-egl7* was transformed into *E. coli* DH10 β for plasmid propagation. Sequencing was performed to analyze possible mutations in the *Af-egl7* sequence and to verify if the sequence had been cloned in frame with α factor signal peptide, which is important to obtain the recombinant enzyme extracellularly in the culture broth.

Next, the recombinant plasmid pPICZ α A/*Af-egl7* was linearized with the restriction enzyme *PmeI* to enable its integration into the *P. pastoris* X-33 genome by homologous recombination, and transformed into this strain. After growth at 30 °C for three days, positive transformants were selected with the Zeocin resistance marker. The 24 selected positive transformants were screened in solid medium containing 1% (*w/v*) CM-Cellulose as a substrate, and 1% (*v/v*) methanol for protein induction (Figure 1). After growth at 30 °C for three days, the plates were stained with Congo Red and further de-stained with NaCl until pale orange zones appeared around the colonies. Degradation halos bigger than the control (ct, *Pichia pastoris* transformed with empty pPICZ α A vector) emerged around all the tested colonies, except for number 4. This indicated expression of a functional enzyme that can degrade CM-Cellulose. Colony PCR also confirmed positive transformants.

Figure 1. Screening of Af-EGL7 activity in 24 *Pichia pastoris* transformants on 1% (w/v) CM-Cellulose plate after heterologous expression induction with 1% (v/v) methanol. The host transformed with empty vector was used as control (ct). Pale orange halos bigger than the control indicated the positive functional colonies.

2.2. Af-EGL7 Expression and Purification

For this study, a positive *P. pastoris* X-33 transformant was selected, and Af-EGL7 was successfully expressed under control of the AOX-1 promoter after induction with 1.5% (v/v) methanol for six days. The culture supernatant was harvested by centrifugation and concentrated by tenfold before Af-EGL7 was purified by Ni²⁺-nitrilotriacetic (Ni-NTA) affinity chromatography. During protein elution, all fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE (Figure 2a). Af-EGL7 eluted from 20 mM imidazole in greater amounts, but the fraction eluted with 80 mM imidazole had higher purity. All the fractions were combined, and the pure protein concentration estimated by the Greenberg method [18] was 450 µg protein·mL⁻¹.

A previous study had indicated that the Af-EGL7 molecular weight is 48 kDa. However, the Af-EGL7 molecular weight estimated by SDS-PAGE herein was approximately 70 kDa. This difference suggested the presence of *N*-glycans in the Af-EGL7 structure, which agreed with the analysis performed by NetGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) predicting four potential *N*-glycosylation sites in the Af-EGL7 structure, at the N96, N201, N205, and N379 residues [4].

Af-EGL7 treatment with Endoglycosidase H produced a protein with a molecular weight of approximately 60 kDa (Figure 2b). However, the molecular mass was still higher than the theoretical value even after deglycosylation. This difference could be due to protein hyperglycosylation, which is common in *P. pastoris* heterologous proteins, and to *O*-glycosylations, which usually occur in GH7 enzymes [19,20].

Figure 2. SDS-PAGE electrophoresis to evaluate (a) Af-EGL7 expression and purification. Lane 1: Molecular weight marker (Precision™ Protein Standards Dual Color; BioRad, Hercules, CA, USA). Lane 2: Flow-through. Lanes 3–7: Fractions obtained after elution with 0 mM imidazole. Lanes 8–17: Fractions obtained after elution with 5, 10, 20, 40, 40, 80, 80, 160, 250, and 500 mM imidazole. (b) Af-EGL7 deglycosylation. Lane 1: Molecular weight marker (Precision™ Protein Standards Dual Color; BioRad). Lane 2: Untreated purified Af-EGL7. The target protein is located with an estimated mass of 70 kDa. Lane 3 and 4: Af-EGL7 after Endo H treatment under non-denaturing and denaturing conditions, respectively. Both deglycosylation reactions produced a purified protein with approximately 60 kDa.

2.3. Biochemical Characterization

2.3.1. Enzyme Activity

In a previous work, our group characterized recombinant Af-EGL7 expressed in *E. coli* and found that this enzyme displays optimal activity at 55 °C and pH 5.0 [4]. Here, recombinant Af-EGL7 expressed in *P. pastoris* also presented optimal activity under these same conditions.

In the present work, the Af-EGL7 V_{max} , K_M , and k_{cat} kinetic parameters were determined at 55 °C by using CM-Cellulose, β -glucan, or Xyloglucan as substrates (Table 1). Af-EGL7 exhibited much higher activity in medium-viscosity barley β -glucan than in low-viscosity CM-Cellulose. This is an intrinsic feature of most GH7 endoglucanases and may be due to the high number of methoxy side chains substituting the CM-Cellulose, which can interfere in enzyme action. It also suggests that Af-EGL7 can hydrolyze both β -1,4- and β -1,3-glycosidic linkages [4,9].

Table 1. Af-EGL7 kinetic parameters.

Substrate	K_M (mg·mL ⁻¹)	V_{max} (μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL·mg ⁻¹ ·s ⁻¹)
CM-Cellulose	24.5 ± 0.6	6193 ± 140	5037 ± 114	205.9 ± 0.8
β-glucan	5.6 ± 0.3	13722 ± 519	11161 ± 422	1992 ± 37
Xyloglucan	8.6 ± 0.3	9082 ± 293	7386 ± 238	859.9 ± 0.2

Comparison of these kinetic parameters with those previously reported for the recombinant Af-EGL7 expressed in *E. coli* [4] revealed high Af-EGL7 catalytic efficiency after its expression in *P. pastoris*, which probably resulted from correct enzyme processing in the eukaryotic strain. The k_{cat}/K_M values in CM-Cellulose and β-glucan calculated for the recombinant Af-EGL7 expressed in *P. pastoris* were 995- and 1419-fold higher than the respective values obtained for the recombinant Af-EGL7 expressed in *E. coli*, respectively.

Furthermore, Af-EGL7 presented higher V_{max} values than most endoglucanases described to date. Actually, the Cel7A V_{max} is 5000 ± 186 μmol·min⁻¹·mg⁻¹ in the substrate barley β-glucan [9]. Hua and collaborators estimated a V_{max} of 12.60 ± 0.64 μg·min⁻¹·mL⁻¹ for Ctendo7 in this same substrate [5]. The V_{max} values reported for Egl7A and MtEg7A in CMC are 2257 ± 79 and 622.5 ± 86.4 μmol·min⁻¹·mg⁻¹, respectively, while the estimated value for an *A. terreus* GH12 endoglucanase is 16.15 μmol·min⁻¹·mg⁻¹ [11,21,22].

The effect of different ions and metals on recombinant Af-EGL7 expressed in *P. pastoris* was also tested herein. The same effect described by Bernardi et al. (2018) occurred [4]. However, considering the important role played by Cu²⁺ in lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) activity and the synergistic effect that LPMO and endoglucanases have on biomass hydrolysis, Af-EGL7 activity was also assessed at different Cu²⁺ concentrations (Table 2) [23].

Table 2. Effect of different Cu²⁺ concentrations on Af-EGL7 activity.

Cu ²⁺ Concentration (mM)	Af-EGL7 Relative Activity (%)
0.0	100.0 ± 1.7
0.1	107.2 ± 1.4
0.5	115.5 ± 0.5
1.0	117.4 ± 0.7
5.0	85.9 ± 1.5
10.0	49.8 ± 1.5
15.0	21.7 ± 0.3

Af-EGL7 activity increased at low Cu²⁺ concentrations (0.1–1.0 mM). Addition of 5, 10 and 15 mM Cu²⁺ partially reduced Af-EGL7 activity to 85%, 49%, and 21%, respectively. These results showed that the association of Af-EGL7 with LPMOs (copper-dependent enzymes) in an enzymatic cocktail is possible, which could enhance cellulose hydrolysis.

2.3.2. Enzyme Stability

CAZymes (carbohydrate-active enzymes) glycosylation has been associated with higher enzyme thermal stability during natural and industrial processes, cellulose hydrolysis or binding, and protection from proteolysis [20,24]. In this sense, herein Af-EGL7 thermal stability was evaluated by pre-incubating the enzyme at different temperatures (55, 60, 70, 80 and 90 °C) for different time intervals.

At 55 °C, the enzyme did not lose activity after incubation for 72 h. However, the enzyme started to lose activity at higher temperatures and retained 61% of its maximal activity after 24 h at 60 °C. After one hour at more extreme temperatures such as 70, 80 and 90 °C, the residual activities were 75%, 60% and 32%, respectively (Figure 3a).

Figure 3. Plots of Af-EGL7 residual activity against incubation time at different temperatures and pH. (a) Af-EGL7 stability at • 55 °C, ■ 60 °C, ▲ 70 °C, ▼ 80 °C, and ♦ 90 °C. (b) Af-EGL7 stability in the pH range 3.0–8.0. Error bars represent standard deviation ($n = 3$).

The comparatively high temperature stability of the enzyme obtained here was surprising. When Af-EGL7 was expressed in *E. coli*, stability at these temperatures decreased rapidly, and residual activity was absent after 30 min at 60–90 °C [4]. Again, the better thermal stability observed in the present study was probably due to enzyme processing during its expression in *P. pastoris*, including post-translational modifications like glycosylation [15,16].

Cellulases from thermophilic microorganisms have commonly been described as having a high thermostability [25,26]. The endoglucanases MtEG7a and Ctendo7 from the thermophilic fungi *M. thermophila* and *C. thermophilum* displayed about 40% and 60% residual activity after eight and one hour at 80 °C, respectively [5,11]. Egl7A and Cel7A from *T. emersonii* and *N. fisheri* retained more than 40% and 16% of their maximal activity after they were incubated at 70 °C for 1 h [9,27] (Table 3).

Our results revealed that Af-EGL7 was remarkably thermostable and withstood high temperatures even in the absence of a substrate. In fact, Af-EGL7 exhibited higher thermal stability than many previously reported thermostable glucanases. Given the numerous advantages of carrying out processes at temperatures above 50 °C, thermostability is one of the most desirable enzymatic properties in the industry [13,28,29]. Steam pre-treatment has been the most frequently employed treatment to make biomass suitable for enzymatic saccharification. Thermostable enzymes can be directly used after this heating step, saving time, expenses, and as well as providing better reaction yields [11,29–31].

Considering the broad range of biotechnological applications that β -glucanases have, great attention has also been directed to obtaining enzymes that are stable over a wide range of pH values. Alkaline-stable cellulases can be primarily applied as additives in washing powder and detergents. Cellulases that are stable under mild conditions (pH 5.0–6.0) can be used in brewing and biofuel production processes [4,11,32]. Acidophilic and acid-stable enzymes are favorable for application in the food and textile industries [16,32]. For this reason, here Af-EGL7 stability was evaluated at a pH ranging from 3.0 to 8.0. The recombinant enzyme was remarkably stable in both acidic and alkaline conditions (Figure 3b).

Analysis of the pH stability after incubation for 72 h did not show any Af-EGL7 activity loss. On the basis of these results, Af-EGL7 exhibited higher pH stability as compared to all the GH7 described so far, for which pH stability was only detected after shorter incubation intervals, as described in Table 3. Therefore, Af-EGL7 can be used in industrial processes over a broad pH range and for long incubation times.

Table 3. Comparison among the catalytic and stability properties of GH7 endoglucanases from different organisms.

Source Organism	Expression System	Substrate	V_{max} (U·mg ⁻¹)	K_M (mg·mL ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL·mg ⁻¹ ·s ⁻¹)	Thermal Stability	pH Stability
<i>Aspergillus fumigatus</i> (this work)	<i>Pichia pastoris</i>	β-Glucan	13722 ± 519	5.6 ± 0.3	11161 ± 422	1992 ± 37	100% after 72 h at 55 °C; 30% after 1 h at 90 °C	No loss after 72 h in the pH range 3.0–8.0
		Xyloglucan	9082 ± 293	8.6 ± 0.3	7386 ± 238	859.9 ± 0.2		
		CMC-Na	6193 ± 140	24.5 ± 0.6	5037 ± 114	205.9 ± 0.8		
<i>Aspergillus fumigatus</i> [4]	<i>Escherichia coli</i>	β-Glucan	191.9 ± 0.0007	113.9 ± 0.005	159.9	1.4	85% after 48 h at 50 °C; 40% after 1 h at 55 °C	Start to decrease after 24 h at pH 6.0
		CMC-Na	51.9 ± 0.007	209.7 ± 0.1	43.3	0.2		
<i>Neosartorya fischeri</i> [9]	<i>Pichia pastoris</i>	β-Glucan	5000 ± 186	4.5 ± 0.2	-	-	16.1% after 1 h at 70 °C	No loss after 1 h in the pH range 3.0–8.0
<i>Talaromyces emersonii</i> [27]	<i>Pichia pastoris</i>	β-Glucan	17951 ± 69	4.0 ± 1.5	-	3156 ± 24	More than 50% after 2 min at 80 °C	More than 70% and 50% after 1 h in the pH range 1.0–11.0 and at pH 12.0, respectively
		CMC-Na	2257 ± 79	20.8 ± 2.1	-	78.9 ± 3.8		
<i>Myceliophthora thermophila</i> [11]	<i>Pichia pastoris</i>	CMC-Na	622.5 ± 86.4	24.0 ± 0.5	-	0.313667	$t_{1/2}$ = 9.96 h (70 °C); $t_{1/2}$ = 6.5 h (80 °C)	No loss after 24 h in the pH range 3.0–11.0
<i>Trichoderma harzianum</i> [12]	<i>Aspergillus niger</i>	Xyloglucan	0.22 ± 0.095 (μM·s ⁻¹)	1.98 ± 0.47	0.45	-	100% after two months of incubation at 55 °C and pH 5.0	-
<i>Chaetomium thermophilum</i> [5]	<i>Pichia pastoris</i>	CMC-Na	59.6 ± 8.2	79.2 ± 5.8	2.11×10^{-3}	0.02673	61.3% after 60 min at 80 °C; Almost all activity lost after 100 min at 90 °C	-
		β-Glucan	12.6 ± 0.6 (μg·min ⁻¹ ·mL ⁻¹)	9.8 ± 0.6	0.7×10^{-3}	0.07849		
<i>Bispora</i> sp. MEY-1 [33]	<i>Pichia pastoris</i>	β-glucan	6737	9.16	-	-	100% after 1 h at 60 °C; More than 30% after 1 h at 70 °C	More than 85% after 1 h in the pH range 1.0–8.0
		CMC-Na	3460	287	-	-		

2.3.3. Af-EGL7 Tolerance to Product Inhibition

Cellobiose and glucose accumulation is one of the factors that limit biomass hydrolysis the most because it reduces enzyme catalytic efficiency and may increase process costs [34–36].

Previously, we described Af-EGL7 activity in xyloglucan [4]. The xyloglucan backbone resembles a cellulose chain: it consists of D-glucan ($\beta 1 \rightarrow 4$) substituted with xylose sidechains, which allows the products' inhibitory effect on Af-EGL7 cellulase activity to be evaluated with precision [32]. In this sense, the effect of different glucose and cellobiose concentrations on Af-EGL activity was evaluated herein by using the chromogenic substrate Azo-Xyloglucan from Tamarind.

Addition of glucose did not affect Af-EGL7 and even enhanced its activity at concentrations higher than 25 mM (Figure 4a). Moreover, 10 mM and 25 mM cellobiose inhibited Af-EGL7 activity by 14% and 23%, respectively. At the highest concentration of this effector (50 mM), residual activity corresponded to 65% (Figure 4b). Similar results were observed for the GH5 endoglucanase Egst: 30 mM glucose stimulated its activity by 1.6-fold, whereas 50 mM cellobiose inhibited its activity by about 33% [34].

Figure 4. Glucose (a) and cellobiose (b) effect on Af-EGL7 activity. Error bars represent the standard deviation ($n = 3$).

These characteristics are highly important and desirable for the application of enzymes during biomass hydrolysis and make Af-EGL7 an enzyme of great commercial interest.

2.4. Enzyme Performance in Agroindustrial Residue Degradation

To analyze the enzyme performance in biomass degradation, 1% of sugarcane bagasse “in natura”, sugarcane exploded bagasse (SEB), rice straw, corncob, barley bagasse or bean straw was added to 0.009 FPU of cellulase cocktail (Celluclast® 1.5L) and 10 μ g of thermostable Af-EGL7 and incubated at 55 °C and 1000 rpm for 24, 48, or 72 h. Interestingly, this enzyme showed a high degree of synergy with the cocktail in the deconstruction of all the tested substrates, except barley bagasse (Figure 5).

Af-EGL7 greatly enhanced the release of reducing sugars over the incubation time. Af-EGL7 synergy was higher in corncob and rice straw as substrates, which increased the amount of released reducing sugars by 128% and 80% after 72 h, respectively, as compared to cocktail alone.

Interesting facts were observed during SEB and sugarcane bagasse “in natura” hydrolysis. Surprisingly, when SEB hydrolysis was performed with the recombinant enzyme alone, released reducing sugars reached up to $1.3\% \pm 0.07$ after 72 h. Besides that, the cocktail hydrolyzed both SEB and sugarcane bagasse “in natura”, which had their conversion enhanced by Af-EGL7 at a similar rate (40–45%) after 72 and 48 h of reaction, respectively.

Figure 5. Effect of the cellulase cocktail Celluclast® 1.5L (Red box) and supplemented by the addition of Af-EGL7 (Blue box), during hydrolysis of the agricultural residues (a) Sugarcane bagasse "in natura", (b) SEB, (c) Rice straw, (d) Corn cob, (e) Barley bagasse and (f) Bean straw. The data represent means $\pm$ standard errors obtained from at least three experimental replicates.

Finally, our data showed that Af-EGL7 was able to improve the hydrolysis of most of the evaluated agricultural residues, which have different compositions (Table S1, [37–40]), revealing a significant enzymatic potential for the industry in terms of efficiency and economy.

3. Materials and Methods

3.1. Strains, Culture Conditions and Vector

Aspergillus fumigatus Af293, kindly donated by Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil), was grown in yeast extract-agar-glucose (YAG) medium (2.0% (*w/v*) dextrose, 2.0% (*w/v*) agar, 0.5% (*w/v*) yeast extract, and 0.1% (*v/v*) trace elements) at 37 °C for two days to obtain a fresh conidium suspension. The conidia were inoculated to a final concentration of 2×10^6 per mL of YNB minimal medium (1 $\times$ salts solution, 0.1% (*v/v*) trace elements, and 0.05% (*w/v*) yeast extract) containing 1% (*w/v*) fructose and incubated at 37 °C and under shaking at 200 rpm for 16 h. Next, the mycelia were harvested, washed, and transferred to YNB medium containing 1% (*w/v*)

sugarcane exploded bagasse (SEB) at 37 °C and 200 rpm for 24 h. Then, the mycelia were harvested for RNA extraction.

The plasmid pPICZ α A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for gene cloning, sequencing, and expression. *Escherichia coli* DH10 β grown at 37 °C and 200 rpm in low salt Luria–Bertani medium supplemented with zeocin (50 μ g·mL^{−1}) was used to propagate the recombinant vector pPICZ α A/*Af-egl7*. *Pichia pastoris* strain X-33 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) cells harboring the recombinant expression vector pPICZ α A/*Af-egl7* were used to produce heterologous protein. The employed growth conditions are described in the EasySelect™ *Pichia* Expression Kit manual (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The low-viscosity substrate CM-Cellulose was purchased from Sigma (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Medium-viscosity Barley β -glucan and Xyloglucan from tamarind seed were acquired from Megazyme (Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland). The natural substrate Sugarcane Exploded Bagasse (SEB) was kindly provided by Prof. Dr. João Atilio Jorge (University of São Paulo). Sugarcane bagasse “in natura” was provided by Prof. Dr. Delia Rita Tapia Blácido (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil). Rice straw, bean straw, barley bagasse, and corncob were provided by Prof. Dr. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil).

3.2. RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Gene Amplification

A. fumigatus mycelia were collected after growth, as described above. After freezing in liquid nitrogen and grinding into a fine powder, total RNA was isolated by using the Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), according to the manufacturer’s instructions. cDNA was synthesized by using SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Specific primer sequences containing overlapping regions between the vector and the insert were employed (F: 5′-GAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCACAACCCGCCGCG-3′ and R: 5′-ATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTAGCAGACACTGAGAGTA-3′; overlapping sites are underlined). The amplification reaction was performed with *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA) by using the follow thermocycling conditions: 98 °C for 30 s; 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; and 72 °C for 10 min. The PCR product was analyzed by electrophoresis and purified from 1% (*w/v*) agarose gel by using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany).

3.3. Cloning, Transformation of *P. pastoris*, and Screening of Recombinant Transformants

The ORF, without predicted signal peptide, was cloned into the vector pPICZ α A (previously digested with the restriction enzymes *Eco*RI and *Xba*I) by the Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) method [17]. The CPEC reaction was performed with *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA); the thermocycling conditions used were as follows: 98 °C for 30 s; 35 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min 30 s; and 72 °C for 10 min. The cloning product was transformed into *E. coli* DH10 β , and the resistant transformants were selected by zeocin (50 μ g·mL^{−1}). The recombinant expression vector pPICZ α A/*Af-egl7* was linearized with the restriction enzyme *Pme*I and transformed into *P. pastoris* X-33 competent cells by electroporation, according to the EasySelect™ *Pichia* Expression Kit manual (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Recombinant transformants with high-level endoglucanase expression were screened in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) plates containing 1% (*w/v*) low-viscosity carboxymethylcellulose (CM-Cellulose), zeocin (100 μ g·mL^{−1}), and 1% (*v/v*) methanol for induction. After incubation at 30 °C for 3 days, the plates were stained with 0.1% (*w/v*) Congo red solution for 20 min and de-stained with 1 M NaCl until pale orange hydrolysis zones appeared against an orange background (approximately 20 min).

3.4. Recombinant Af-EGL7 Heterologous Expression in *P. pastoris*

A single colony of recombinant *P. pastoris* X-33 harboring the vector pPICZ α A/*Af-egl7* was inoculated in buffered glycerol-complex medium (BMGY) (2% (*w/v*) peptone, 1.34% (*w/v*) yeast nitrogen base, 1% (*w/v*) yeast extract, 1% (*v/v*) glycerol, 4×10^{-5} % (*w/v*) biotin, 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0) and grown at 30 °C and 240 rpm until the culture reached log phase growth ($O.D_{600nm} = 2-6$). Then, the cells were harvested by centrifugation at 3000 $\times$ g for 5 min and resuspended in buffered methanol-complex medium (BMMY) (2% (*w/v*) peptone, 1.5% (*v/v*) methanol, 1.34% (*w/v*) yeast nitrogen base, 1% (*w/v*) yeast extract, 4×10^{-5} % (*w/v*) biotin, 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0) to an $O.D_{600nm} = 1$. Af-EGL7 expression was induced at 30 °C and 240 rpm for 6 days (optimal time) under the control of the AOX1 promoter. Additional 1.5% (*v/v*) final concentration methanol was added to the medium every 24 h to maintain the expression levels. Once the *Af-egl7* gene was fused with the α -factor signal sequence, the recombinant protein was obtained extracellularly.

3.5. Recombinant Af-EGL7 Purification

After 6-day culture, the culture supernatant was collected by centrifugation at 3000 $\times$ g for 5 min and concentrated to the maximum by using an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter—10 kDa cutoff (Millipore, Burlington, MS, USA). Next, the concentrate was resuspended in 20 mM sodium phosphate buffer containing 500 mM NaCl (pH 7.4) and loaded onto Ni Sepharose 6 Fast Flow resin (Ge Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) pre-equilibrated with the same buffer. After incubation at 4 °C for 1.5 h under stirring, a linear gradient from 0 to 500 mM imidazole in 20 mM sodium phosphate buffer containing 500 mM NaCl (pH 7.4) was applied to the column to elute the His₆-tagged recombinant endoglucanase. All the fractions were collected, and protein was analyzed by 10% (*w/v*) SDS-PAGE, stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

The fractions containing purified Af-EGL7 were mixed and submitted to buffer-exchange by using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter—10 kDa cutoff to remove excess imidazole prior to the subsequent enzymatic assays.

3.6. Endoglucanase Activity Assay

Af-EGL7 activity was determined by measuring reducing sugars from the reaction by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [41]. The enzymatic reactions were performed as described by Bernardi et al., 2018 [4]. Briefly, the reaction mixture consisting of 1% (*w/v*) CM-Cellulose in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was incubated at 55 °C for 10 min. The enzyme action was stopped by adding an equal volume of the DNS reagent. The mixture was boiled for 5 min and cooled down, and the absorbance was measured at 540 nm. One unit of endoglucanase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of reducing sugar from the substrate per minute. Each assay was carried out in triplicate. Protein concentration was determined by the Greenberg method [18].

The effect of different Cu²⁺ concentrations (from 0 to 15 mM) on the Af-EGL7 activity was also tested. The reactions were performed as described above.

3.7. Af-EGL7 Deglycosylation by Endo H

Purified Af-EGL7 deglycosylation was accomplished by Endoglycosidase H (Endo H, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) in both denaturing and non-denaturing conditions, according to the manufacturer's instructions. In the first case, the recombinant protein was initially denatured at 100 °C for 10 min. Then, the deglycosylation reaction was performed at 37 °C for 24 h, as described by Meleiro et al. (2017) [34]. Proteins were further analyzed by SDS-PAGE.

3.8. Af-EGL7 Stability Assays

Thermostability was determined by pre-incubating 0.05 μ g of purified Af-EGL7 in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) without substrate, at temperatures ranging from 55 to 90 °C for durations

ranging from 30 min to 72 h. The residual activities were measured under standard conditions (pH 5.0, 55 °C, 10 min), as described in Section 3.6. The pH stability was estimated by measuring the residual enzymatic activity under standard conditions after incubation of the enzyme without substrate in McIlvaine (citrate–phosphate) buffers pH 3.0–8.0 at 4 °C for up to 72 h [4].

3.9. Determination of Kinetic Parameters

The Af-EGL7 kinetic parameters (K_M , V_{max} , and k_{cat}) were determined when CM-Cellulose (2.5–30 mg·mL^{−1}), β -glucan (0.5–15 mg·mL^{−1}), or xyloglucan (1.0–8.5 mg·mL^{−1}) were used as substrates. The reactions were performed in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) as previously described. The parameters were calculated by linear regression, by using the Lineweaver–Burk graphical method.

3.10. Glucose and Cellobiose Effect on Af-EGL7 Activity

The glucose and cellobiose effect on Af-EGL7 activity was determined in the presence of increasing concentrations (0.5–50 mM) of both sugars by using the chromogenic substrate Azo-Xyloglucan from Tamarind (Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland). The enzymatic assays were performed in 85 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) at 40 °C for 10 min, according to the manufacturer's instructions, with slight modifications. The reactions were stopped by adding 1.7 volumes of absolute ethanol. The supernatants were harvested by centrifugation at 1000× *g* for 10 min, and the absorbances were measured at 590 nm. Enzyme activity without glucose or cellobiose addition was considered 100%.

3.11. Lignocellulosic Biomass saccharification

Lignocellulose enzymatic hydrolysis was carried out as described previously by Bernardi et al. (2018) with some modifications [4]. The saccharification was accomplished in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 1% (*w/v*) of one of the following biomasses: sugarcane bagasse “in natura”, SEB, rice straw, corncob, barley bagasse, or bean straw.

The reactions consisted of 0.009 FPU Celluclast® 1.5L (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 10 μ g of Af-EGL7, added per 10 mg of each biomass. The reactions were conducted at 55 °C and 1000 rpm for up to 72 h in a final volume of 1 mL. DNS was added to stop the reactions and to measure the released reducing sugars. Control experiments were conducted in the same way, in the absence of Af-EGL7. The reported results represent the means $\pm$ SD calculated from at least three experimental replicates.

3.12. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean of replicates $\pm$ SD. Significant differences between the treatment groups were analyzed by using Tukey's test (significance, $p < 0.05$).

3.13. Reproducibility of the Results

All the data are the mean of at least three independent experiments and show consistent results.

4. Conclusions

At the industrial level, it is essential that enzymes maintain their activity at high temperatures and high pH values. This study has shown a GH7 endoglucanase with favorable properties for industrial applications, such as high thermal and pH stabilities. In addition, Af-EGL7 can be considered as a good hydrolytic enzyme that can improve biomass degradation by Celluclast® 1.5L. Besides that, Af-EGL7 is a glucose-cellobiose-tolerant endoglucanase. All these properties make Af-EGL7 an important candidate for application in the improvement of commercial cocktails used in second-generation biofuel production as well as in other biorefinary processes.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2261/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.V.B. and T.M.D.; data curation, A.V.B. and D.K.Y.; formal analysis, A.V.B.; methodology, A.V.B. and D.K.Y.; supervision, S.A.U. and T.M.D.; writing (Review and Editing), A.V.B., S.A.U., and T.M.D.; project Administration, T.M.D.; funding Acquisition, T.M.D.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2014/10466-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 425465/2016-0). AVB was funded by a scholarship granted by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Finance Code 001. DKY was funded by a scholarship granted by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2018/11231-7).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Jain, K.K.; Kumar, S.; Bhardwaj, K.N.; Kuhad, R.C. Functional Expression of a Thermostable Endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* RCKK in *Pichia pastoris* X-33 and Its Characterization. *Mol. Biotechnol.* **2018**, *60*, 736–748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Silva, T.P.; de Albuquerque, F.S.; dos Santos, C.W.V.; Franco, M.; Caetano, L.C.; Pereira, H.J.V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. *Bioresour. Technol.* **2018**, *270*, 263–269. [\[CrossRef\]](#)
3. Ramos, J.L.; Duque, E. Twenty-first-century chemical odyssey: Fuels versus commodities and cell factories versus chemical plants. *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 200–209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Bernardi, A.V.; De Gouvêa, P.F.; Gerolamo, L.E.; Yonamine, D.K.; De Lourdes, L.; Balico, D.L.; Uyemura, S.A. Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application. *Protein Expr. Purif.* **2018**, *150*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Hua, C.; Li, W.; Han, W.; Wang, Q.; Bi, P.; Han, C.; Zhu, L. Characterization of a novel thermostable GH7 endoglucanase from *Chaetomium thermophilum* capable of xylan hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *117*, 342–349. [\[CrossRef\]](#)
6. Rigoldi, F.; Donini, S.; Redaelli, A.; Parisini, E.; Gautieri, A. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioeng.* **2018**, *2*. [\[CrossRef\]](#)
7. de Gouvêa, P.F.; Bernardi, A.V.; Gerolamo, L.E.; Santos, E.S.; Riano-Pachon, D.; Uyemura, S.A.; Dinamarco, T.M. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. *BMC Genomics* **2018**, *19*, 1–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Aich, S.; Singh, R.K.; Kundu, P.; Pandey, S.P.; Datta, S. Genome-wide characterization of cellulases from the hemi-biotrophic plant pathogen, *Bipolaris sorokiniana*, reveals the presence of a highly stable GH7 endoglucanase. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
9. Liu, Y.; Dun, B.; Shi, P.; Ma, R.; Luo, H.; Bai, Y.; Xie, X.; Yao, B. A novel GH7 Endo- β -1,4-glucanase from *Neosartorya fischeri* P1 with good thermostability, broad substrate specificity and potential application in the brewing industry. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137485. [\[CrossRef\]](#)
10. Berto, G.L.; Velasco, J.; Tasso Cabos Ribeiro, C.; Zanphorlin, L.M.; Noronha Domingues, M.; Tyago Murakami, M.; Polikarpov, I.; de Oliveira, L.C.; Ferraz, A.; Segato, F. Functional characterization and comparative analysis of two heterologous endoglucanases from diverging subfamilies of glycosyl hydrolase family 45. *Enzyme Microb. Technol.* **2019**, *120*, 23–35. [\[CrossRef\]](#)
11. Karnaouri, A.C.; Topakas, E.; Christakopoulos, P. Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 231–242. [\[CrossRef\]](#)
12. Pellegrini, V.O.A.; Serpa, V.I.; Godoy, A.S.; Camilo, C.M.; Bernardes, A.; Rezende, C.A.; Junior, N.P.; Franco Cairo, J.P.L.; Squina, F.M.; Polikarpov, I. Recombinant *Trichoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 9591–9604. [\[CrossRef\]](#)
13. Moroz, O.V.; Maranta, M.; Shaghasi, T.; Harris, P.V.; Wilson, K.S.; Davies, G.J. The three-dimensional structure of the cellobiohydrolase Cel7A from *Aspergillus fumigatus* at 1.5Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.* **2015**, *71*, 114–120. [\[CrossRef\]](#)

14. Miao, J.; Li, T.; Ma, L.; Liu, D.; Shen, Q.; Wang, M.; Huang, Q. Effects of amino acids on the lignocellulose degradation by *Aspergillus fumigatus* Z5: Insights into performance, transcriptional, and proteomic profiles. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 1–19. [[CrossRef](#)]
15. Chahed, H.; Boumaiza, M.; Ezzine, A.; Marzouki, M.N. Heterologous expression and biochemical characterization of a novel thermostable *Sclerotinia sclerotiorum* GH45 endoglucanase in *Pichia pastoris*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *106*, 629–635. [[CrossRef](#)]
16. Akbarzadeh, A.; Ranaei Siadat, S.O.; Motallebi, M.; Zamani, M.R.; Barshan Tashnizi, M.; Moshtaghi, S. Characterization and high level expression of acidic endoglucanase in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 2253–2265. [[CrossRef](#)]
17. Quan, J.; Tian, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 242–251. [[CrossRef](#)]
18. David, B.Y. The colorimetric determination of the serum proteins. *J. Biol. Chem.* **1929**, *82*, 545–550.
19. Hamilton, S.R.; Gerngross, T.U. Glycosylation engineering in yeast: The advent of fully humanized yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 387–392. [[CrossRef](#)]
20. Amore, A.; Knott, B.C.; Supekar, N.T.; Shajahan, A.; Azadi, P.; Zhao, P.; Wells, L.; Linger, J.G.; Hobdey, S.E.; Vander Wall, T.A.; et al. Distinct roles of N- and O-glycans in cellulase activity and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 13667–13672. [[CrossRef](#)]
21. Wang, J.; Wang, J.; Gao, G.; Li, Y.; Yang, L.; Liang, Y.; Jin, H.; Han, W.; Feng, Y.; Zhang, Z. Cloning, expression, and characterization of a thermophilic endoglucanase, AcCel12B from *Acidothermus cellulolyticus* 11B. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 25080–25095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. 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. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2014**, *88*, 150–161. [[CrossRef](#)]
23. Valenzuela, S.V.; Valls, C.; Schink, V.; Sánchez, D.; Roncero, M.B.; Diaz, P.; Martínez, J.; Pastor, F.I.J. Differential activity of lytic polysaccharide monooxygenases on celluloses of different crystallinity. Effectiveness in the sustainable production of cellulose nanofibrils. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *207*, 59–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. 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. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, J.; Kang, L.; Liu, Z.; Yuan, S. Gene cloning, heterologous expression and characterization of a *Coprinopsis cinerea* endo- β -1,3(4)-glucanase. *Fungal Biol.* **2017**, *121*, 61–68. [[CrossRef](#)]
26. Patel, A.K.; Singhania, R.R.; Sim, S.J.; Pandey, A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. *Bioresour. Technol.* **2019**, *279*, 385–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wang, K.; Luo, H.; Shi, P.; Huang, H.; Bai, Y.; Yao, B. A highly-active endo-1,3-1,4- β -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394.64 with application potential in the brewing and feed industries. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 1448–1456. [[CrossRef](#)]
28. Mohd Azhar, S.H.; Abdulla, R.; Jambo, S.A.; Marbawi, H.; Gansau, J.A.; Mohd Faik, A.A.; Rodrigues, K.F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem. Biophys. Reports.* **2017**, *10*, 52–61. [[CrossRef](#)]
29. Azizi, M.; Hemmat, J.; Seifati, S.M.; Torktaz, I.; Karimi, S. Characterization of a thermostable endoglucanase produced by *Isophtericola variabilis* sp. IDAH9. *Brazilian J. Microbiol.* **2015**, *46*, 1225–1234. [[CrossRef](#)]
30. Brodeur, G.; Yau, E.; Badal, K.; Collier, J.; Ramachandran, K.B.; Ramakrishnan, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Res.* **2011**, *2011*, 1–17. [[CrossRef](#)]
31. Kumar, P.; Barrett, D.M.; Delwiche, M.J.; Stroeve, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 3713–3729. [[CrossRef](#)]
32. Zhao, J.; Shi, P.; Yuan, T.; Huang, H.; Li, Z.; Meng, K.; Yang, P.; Yao, B. Purification, gene cloning and characterization of an acidic β -1,4-glucanase from *Phialophora* sp. G5 with potential applications in the brewing and feed industries. *J. Biosci. Bioeng.* **2012**, *114*, 379–384. [[CrossRef](#)]
33. Luo, H.; Yang, J.; Li, J.; Shi, P.; Huang, H.; Bai, Y.; Fan, Y.; Yao, B. Molecular cloning and characterization of the novel acidic xylanase XYLD from *Bispora* sp. MEY-1 that is homologous to family 30 glycosyl hydrolases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1829–1839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Meleiro, L.P.; Carli, S.; Fonseca-Maldonado, R.; da Silva Torricillas, M.; Zimbardi, A.L.R.L.; Ward, R.J.; Jorge, J.A.; Furriel, R.P.M. Overexpression of a Cellobiose-Glucose-Halotolerant Endoglucanase from *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Pei, J.; Pang, Q.; Zhao, L.; Fan, S.; Shi, H. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: A glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 1–10. [[CrossRef](#)]
36. Andrić, P.; Meyer, A.S.; Jensen, P.A.; Dam-Johansen, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 308–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kim, M.; Day, D.F. Composition of sugarcane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 803–807. [[CrossRef](#)]
38. Prasad, S.; Singh, A.; Joshi, H.C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Res. Conserv. Recycl.* **2007**, *50*, 1–39. [[CrossRef](#)]
39. Mello, L.R.P.F.; Mali, S. Use of malt bagasse to produce biodegradable baked foams made from cassava starch. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *55*, 187–193. [[CrossRef](#)]
40. Brum, S.S.; de Oliveira, L.C.A.; Bianchi, M.L.; Guerreiro, M.C.; de Oliveira, L.K.; Carvalho, K.T.G. Síntese de acetato de celulose a partir da palha de feijão utilizando *N*-bromossuccinimida (NBS) como catalisador. *Polímeros* **2012**, *22*, 447–452. [[CrossRef](#)]
41. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–428. [[CrossRef](#)]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Contents lists available at ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep Functional characterization of GH7 endo-1,4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application

Aline Vianna Bernardi^a, Paula Fagundes de Gouvêa^a, Luis Eduardo Gerolamo^a,
Deborah Kimie Yonamine^a, Laís de Lourdes de Lima Balico^b, Sergio Akira Uyemura^b,
Taisa Magnani Dinamarco^{a,*}

^a Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^b Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Aspergillus fumigatus

GH7

β -glucanase

Protein expression

Lignocellulose breakdown

ABSTRACT

A gene encoding an endo-1,4- β -glucanase (Afu6g01800) from *A. fumigatus* was cloned into the vector pET-28a (+) and expressed in the *E. coli* strain RosettaTM (DE3) pLysS. Sequence analysis indicated that the enzyme Af-EGl7 belonged to the GH7 family. The gene *Af-egl7* encoded a protein comprising 460 amino acids, with a CBM1 domain at residues 424–460 and molecular mass of 52 kDa, as estimated by SDS-PAGE. This enzyme was optimally active at pH and temperatures ranging from 4.5 to 5.5 and from 40 to 60 °C, respectively. Mn^{2+} addition significantly enhanced the Af-EGl7 cellulase activity by 233%, whereas SDS addition fully inhibited this activity. Higher activity was observed toward β -glucan than toward xyloglucan and CM-Cellulose, suggesting that the enzyme corresponds to a β -1,3-1,4-glucanase. qRT-PCR in different culture media helped to establish the time-course expression profile. Different polysaccharides induced the gene *Af-egl7* in a time-dependent manner; in the particular case of the substrate sugarcane exploded bagasse (SEB), *Af-egl7* was induced 2500-fold. Upon addition to a commercial cellulase cocktail, Af-EGl7 significantly improved SEB saccharification, which suggested that the enzyme Af-EGl7 had great potential to hydrolyze complex biomass. From a biotechnological point of view, *A. fumigatus* Af-EGl7 is a promising candidate to enhance enzyme cocktails used in biorefineries such as consolidated bioprocessing.

1. Introduction

Recently, there has been great economic and environmental concern about energy sources. To prevent issues regarding fossil fuel scarcity and/or limited fossil fuel use for environmental reasons, searching for alternative renewable and sustainable energy sources has become an urgent matter. Employing agricultural residues as lignocellulosic materials is one of the most relevant strategies to produce second-generation (2G) ethanol. 2G ethanol production comprises at least three steps: pre-treatment, hydrolysis, and fermentation. The main bottleneck of this process is that enzymes used during the biomass hydrolysis step are expensive. Obtaining low-cost cellulases remains a great challenge when it comes to developing a sustainable process to produce 2G ethanol [1,2].

Cellulose is the major plant biomass component, and it is the most abundant polysaccharide on Earth [1,3]. Cellulose is a linear polymer

comprising 7000–15000 glucose monomers linked by β -1,4-glycosidic bonds and intramolecular hydrogen bonds [3,4]. In nature, cellulose occurs as microfibrils with diameters of 2–10 nm, and it consists of 30–36 cellulosic fibers laterally aggregated by intermolecular hydrogen bonds and van der Waals forces [5]. Classic native cellulose degradation requires that three types of hydrolytic enzymes—endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolases (EC 3.2.1.9), and β -glucosidases (EC 3.2.1.21)—act synergistically [6]. Endoglucanases catalyze initial attack on the polymer and account for random cleavage of the β -1,4-glycosidic bonds present in the cellulose chain amorphous regions [7]. This action releases smaller fragments that facilitate subsequent hydrolysis by the other two mentioned cellulases [8].

In recent years, endoglucanases have gained special attention due to their industrial and biotechnological applications; e.g., in the textile, animal food, food, and biofuel industries [8]. During 2G ethanol production, cellulose depolymerization into glucose monomers is essential

* Corresponding author. USP - Universidade de São Paulo - SA, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 (16) 33159121; fax: +55(16) 33159101.

E-mail addresses: alinebernardi@gmail.com (A.V. Bernardi), paulafagouvea@yahoo.com.br (P.F. de Gouvêa), gerolamo00@hotmail.com (L.E. Gerolamo), deborah.yonamine@hotmail.com (D.K. Yonamine), laibalico@hotmail.com (L. de Lourdes de Lima Balico), suyemura@ffclrp.usp.br (S.A. Uyemura), tdinamarco@ffclrp.usp.br (T.M. Dinamarco).

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.04.016>

Received 12 March 2018; Received in revised form 24 April 2018; Accepted 24 April 2018

Available online 30 April 2018

1046-5928/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

for efficient fermentation; enzymatic hydrolysis is preferable in this process [9].

Filamentous fungi such as *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus fumigatus* play an important role in the secretion of endo-1,4- β -glucanases and other carbohydrate-active enzymes (CAZymes), which can act synergistically to break down biomass [10–15].

A. fumigatus is a pathogenic and opportunistic fungus that can cause a variety of allergic reactions. However, this fungus can produce many CAZymes that act synergistically to increase the enzymatic activity during lignocellulosic biomass breakdown [15,16]. When this fungus is cultivated in the presence of sugarcane bagasse, it secretes several important CAZymes involved in lignocellulose degradation. Such CAZymes include endoglucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolases (EC 3.2.1.9), β -glucosidases (EC 3.2.1.21), endoxylanases (EC 3.2.1.32) and xylosidases (EC 3.2.1.37), which can withstand elevated temperatures [17–20]. Among these CAZymes, a GH7 endo-1,4- β -glucanase Afu6g01800 (GenBank access number XM_742,804.1) was significantly up-regulated in RNAseq data ($\log_2FC = 9.575$) [15]. This enzyme can cleave internal glucosidic bonds in the cellulose microfibril crystalline structure: thanks to the presence of a CBM1 domain in its structure, it acts on β -1,3- and β -1,4-glycosidic bonds through a retaining catalytic mechanism [16,21,22].

Endoglucanases secreted by fungi are stable at high temperatures [23,24], but few papers have described and characterized endoglucanases secreted by *A. fumigatus* [7,16,22,25].

Here, we purified and characterized a novel GH7 endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* Af293 that can be further used to supplement enzyme cocktails.

2. Materials and methods

2.1. Strains, culture conditions, and vectors

The *A. fumigatus* strain Af293, gently donated by the Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura (University of São Paulo, BR), was cultivated in YAG medium [2.0% (w/v) dextrose, 2.0% (w/v) agar, 0.5% (w/v) yeast extract, and 0.1% (v/v) trace elements at 37 °C for two days to obtain a fresh conidium suspension. For qRT-PCR, the conidia were inoculated to a final concentration of 1×10^6 per 50 mL of YNB medium containing 1% (w/v) fructose and incubated at 37 °C and under shaking at 200 rpm for 16 h. Next, the mycelia were harvested, washed, and transferred to YNB medium containing 1% (w/v) fructose, 1% (w/v) sugarcane exploded bagasse (SEB) (47.5% cellulose; 9.0% hemicellulose and 34.3% lignin), 1% (w/v) CM-Cellulose, 1% (w/v) β -glucan, 1% (w/v) xyloglucan, and 1% (w/v) Avicel at 37 °C and 200 rpm for 3, 6, 12, and 24 h. Then, the mycelia were harvested by centrifugation for RNA purification.

The vector pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) was used for gene cloning and sequencing. The recombinant vector was transformed into *E. coli* DH10 β . The vector pET-28a(+) (Novagen, Darmstadt, HE, Germany) was constructed for recombinant protein expression in *E. coli* Rosetta[™] (DE3) pLysS.

2.2. Sequence and structural analysis

The signal peptide in Af-EGL7 was predicted with SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The potential N-glycosylation sites were predicted with the NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Multiple sequence alignment was carried out with the Clustal Omega tool (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Homology modeling was conducted with the software Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). The three-dimensional structure of the protein modeled with Phyre2 was analyzed with the aid of the Swiss PDB viewer.

2.3. RNA isolation, cDNA synthesis, and gene amplification and cloning

Total RNA was isolated from *A. fumigatus* mycelia by using the kit Direct-zol[™] RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA by using SuperScript[®] II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The gene *Af-egl7* full-length cDNA was amplified by PCR; specific primer sequences were employed (F: 5'-GAATTCATGGA CTCCAAAAGAGGCGT-3' and R: 5'-AAGCTTCTACAGACACTGAGAGT ACC-3'; restriction sites in bold). The temperatures used during the amplification reactions performed with Platinum[®] Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were as follows: 94 °C for 5 min; 30 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 68 °C for 2 min; and 68 °C for 10 min. The PCR-amplified fragments were purified with the aid of the kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Germany).

The amplified product was cloned into the vector pGEM[®]-T Easy and transformed into *E. coli* DH10 β . The recombinant vector *Af-egl7*/pGEM-T Easy was digested with the restriction enzymes *Eco*RI and *Hind*III, and fragment *Af-egl7* was cloned into the vector pET-28a(+) containing an N-terminal His₆-tag. The protein was expressed by transformation into the *E. coli* strain Rosetta[™] (DE3) pLysS.

2.4. qRT-PCR analysis

RNA was extracted, and cDNA was synthesized as described previously. Quantitative PCR (qPCR) analyses were accomplished according to Semighini et al. [26]. The endoglucanase mRNA abundance was normalized with β -tubulin probes. Table S1 lists the primer sequences. The reactions were carried out as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Each experiment was performed in triplicate, and three different biological experiments were conducted.

2.5. Recombinant Af-EGL7 heterologous expression in *E. coli*

The *E. coli* strain Rosetta[™] (DE3) pLysS harboring the recombinant vector *Af-egl7*/pET-28a(+) was inoculated into LB medium [1% (w/v) tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, and 1% (w/v) NaCl] added with 1% (w/v) glucose, kanamycin 50 μ g mL⁻¹, and chloramphenicol 25 μ g mL⁻¹ and incubated at 37 °C for 16 h. After this period, the culture was transferred to TB medium [2.4% (w/v) yeast extract, 1.2% (w/v) tryptone, 0.4% (v/v) glycerol, 17 mM KH₂PO₄, and 72 mM K₂HPO₄] added with 1% (w/v) glucose, 50 μ g mL⁻¹ kanamycin, and 25 μ g mL⁻¹ chloramphenicol and incubated at 37 °C and 200 rpm until O.D._{600nm} 0.4–0.6 was achieved. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 1 mM, and the culture was incubated under the same conditions for 4 h.

2.6. Protein purification and refolding

After protein expression, the cell pellets were harvested by centrifugation at 4 °C and 18,514 g for 10 min. The inclusion bodies were purified and denatured according to the protocols described in the kit "iFOLD[™] Protein Refolding System 1" (Novagen, Darmstadt, HE, Germany). After dialysis against 1x iFOLD dialysis buffer [Tris 10 mM, TCEP 0.1 mM, 0.05 mM EDTA, and 0.06% (v/v) N-Lauroylsarcosine; pH 8.0], protein refolding was performed in C9 buffer [50 mM Tris, 12.5 mM Cyclodextrin, and 1 mM EDTA; pH 7.5]. The protein was loaded onto a dialysis membrane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which was soaked in C9 buffer and incubated at 4 °C for 48 h, under stirring.

2.7. SDS-PAGE and zymogram analysis

The Af-EGL7 purity and molecular weight were analyzed by 10% (w/v) SDS-PAGE, stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. For the

Zymogram analysis, 10% (w/v) SDS-PAGE containing 1% (w/v) CM-Cellulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or 1% (w/v) barley β -glucan (Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland) were used. Before loading onto the gels, 15 μ g of the enzyme was mixed with a non-reducing 5x sample buffer. After electrophoresis, the gels were soaked twice in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 1% (v/v) Triton X-100 for 30 min to remove SDS and to allow enzyme re-folding. The gels were soaked in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) for 15 min, for washing, and incubated in the same buffer at 55 °C for 30 min. Dipping the gels into a 4% (v/v) acetic acid solution stopped the enzymatic reactions. Finally, the gels were stained with 0.1% (w/v) Congo red solution for 30 min and de-stained with 1 M NaCl until pale-red hydrolysis zones appeared against a red background.

2.8. Enzyme assay

The Af-EGl7 activity was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reducing sugar method [27]. The reaction system consisted of 1% (w/v) CM-Cellulose in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and 50 μ g of purified enzyme in a final volume of 100 μ L. The reaction was incubated at 55 °C for 10 min and stopped by addition of 100 μ L of the DNS reagent. The mixture was boiled for 5 min and cooled down to room temperature. The absorbance was measured at 540 nm. One unit of endoglucanase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of reducing sugar from the substrate per minute. Each assay was carried out in triplicate. The protein concentration was determined by the Greenberg method [28].

2.9. Purified Af-EGl7 characterization

The optimal pH was determined from 3.0 to 8.0, in McIlvaine buffer (citric acid- Na_2HPO_4) [29]. The pH stability was estimated by measuring the residual enzymatic activity under standard conditions (pH 5.0, 55 °C, 10 min) after the enzyme was incubated in McIlvaine buffers pH 3.0–8.0 without substrate at 4 °C for 24 h.

The optimal temperature was determined from 30 to 80 °C. The thermal stability was estimated by measuring the residual enzymatic activity under standard conditions, after the enzyme was incubated without substrate at 30–80 °C for 30 min. Stability at the optimal temperature and 50 °C was determined by measuring the residual enzymatic activity under standard conditions after incubation at 50 or 55 °C for 0.5, 1, 5, 24, and 48 h. The thermal stability was also measured in the presence of 5 mM MnCl_2 or 5 mM L-cysteine.

The effects of different ions and reagents on the Af-EGl7 activity were measured after addition of 5 mM (final concentration) of MnCl_2 , CoCl_2 , CaCl_2 , FeSO_4 , MgSO_4 , NiSO_4 , NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ZnSO_4 , CuSO_4 , AgNO_3 , DTT, L-cysteine, β -mercaptoethanol, DMSO, EDTA, Tween 20, or SDS. The activity of the system without any additive was considered 100%. The effect of different MnCl_2 concentrations (from 0.1 to 20 mM) on the Af-EGl7 activity was tested.

The substrate specificity was determined by measuring the Af-EGl7 activity toward 0.5% (w/v) barley β -glucan, 0.5% (w/v) xyloglucan (Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland), 0.5% (w/v) Avicel® PH-101 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 0.5% (w/v) beech wood xylan (Megazyme International, Bray, Co. Wicklow, Ireland) as substrates, considering that the activity toward CM-Cellulose was 100%. The reactions were performed at pH 5.0 and 55 °C for 10 min.

2.10. Kinetic assays

The kinetic parameters (K_M , V_{max} , and k_{cat}) were determined in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 0.5–30 mg mL^{-1} CM-Cellulose or 0.5–15 mg mL^{-1} β -glucan after incubation with purified Af-EGl7 in the presence of 5 mM MnCl_2 at pH 5.0 at 55 °C for 10 min. The data were plotted according to the Lineweaver–Burk method.

2.11. Enzymatic saccharification

The enzymatic hydrolysis of SEB was carried out as described previously [30] with slight modifications. The enzymatic hydrolysis was accomplished in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 5 mM MnCl_2 , containing 1% (w/v) SEB. Celluclast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.9 FPU/g of substrate and 500 μ g of Af-EGl7/g of substrate were added. The reaction (1 mL) was conducted in Eppendorf tubes (2 mL) at 50 °C and 1000 rpm for up to 72 h; a ThermoMixer (Eppendorf, Hamburg, Germany) was employed. The control experiments were conducted under the same conditions without Af-EGl7.

After the reaction, reducing sugars were determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay at 540 nm; D-glucose was used as the standard [27]. All the enzyme assays were replicated at least three times with appropriate controls.

3. Results and discussion

3.1. Af-EGl7 sequence and structural analysis

We cloned and overexpressed the endo-1,4- β -glucanase *A. fumigatus* gene *Af-egl7* (AFu6g01800) in the *E. coli* strain Rosetta™ (DE3) pLysS and characterized the recombinant enzyme Af-EGl7. Af-EGl7 shares 95% identity with the sequence published by Liu et al. [31]. However, there is no report of *Af-egl7* cloning, expression, or characterization, and our findings suggest a different mode of action and activity as compared to the modes of actions and activities reported previously. Thus, this is the first report on the characterization of this enzyme.

The gene *Af-egl7* (GenBank access number XM_742,804.1) is 1383 bp long, encodes 460 amino acid residues, and has an estimated molecular mass of 48 kDa. Based on sequence similarity, we classified the recombinant enzyme into glycoside hydrolase family 7 (GH7) and identified a carbohydrate-binding module (CBM1) at the C-terminus, at residues 424–460 (PTQTHYGQCGGWTGPTACASPYTCQVLNPWY-SQCL). CBM is an important module for protein recognition and substrate binding and can boost catalytic efficiency [32,33]. In addition, it is related to hydrolysis of crystalline cellulose at different sites [34]. The *A. fumigatus* genome contains two genes encoding GH7 endoglucanases (AFu7g01540 and AFu6g01800); however, Af-EGl7 is the only enzyme displaying a CBM module [22].

Multiple alignment results (Fig. 1a) revealed identity with other endoglucanases belonging to GH7. Af-EGl7 shares 95% identity with *N. fischeri* [31], 64% identity with *M. thermophila* [35], 63% identity with *T. reesei* and *T. harzianum* [36,37], and 61% identity with *T. emersonii* [38]. Furthermore, we manipulated the Af-EGl7 three-dimensional structure with the Swiss-PDB viewer on the basis of the homology modeling performed with the program Phyre2 (95% of the residues were modeled with over 90% confidence). We observed that some amino acid residues that are important for protein structure and activity were conserved. Two putative catalytic residues, E215 and E220, which correspond to the proton donor and to the proton acceptor, respectively, are conserved among GH7 endoglucanases and are highlighted in green in Fig. 1b. Twenty cysteine residues (C38, C44, C69, C80, C86, C90, C158, C190, C194, C212, C213, C233, C238, C243, C316, C365, C432, C443, C449, and C459), related to ten disulfide bonds (Fig. 1c), are also highly conserved in other GH7 endoglucanases. Disulfide bonds are critical for correct protein folding and maintenance of the three-dimensional structure of thermostable enzymes [39].

SignalP analysis revealed an N-terminal signal peptide at residues 1–20 (MDSKRGVVAAVLALLPLVSA), suggesting that Af-EGl7 can be secreted extracellularly. There are four potential N-glycosylation sites (N96, N201, N205, and N379) that are highly conserved among GH7 endoglucanases from other *Aspergillus* species, such as *A. fischeri* (ALE19913.1), *A. lentulus* (GAQ03870.1), *A. udagawae* (GAO84310.1), *A. terreus* NIH 2624 (XP_001217291.1), *A. clavatus* NRRL 1 (XP_001270378.1), and *A. rambellii* (KKK13555.1). The N-glycans

B **C**

Fig. 1. (continued)

present in different positions can influence protein secretion, folding, stability, and other enzymatic properties [39].

3.2. *Af-egl7* transcriptional profiling during *A. fumigatus* culture in different substrates

To gain more insight into *Af-egl7* gene expression in different carbon sources, we performed qRT-PCR during *A. fumigatus* cultivation in 1% (w/v) SEB, 1% (w/v) CM-Cellulose, 1% (w/v) barley β -glucan, 1% (w/v) xyloglucan, and 1% (w/v) Avicel for 3, 6, 12, and 24 h. Fig. 2 illustrates the expression profile behavior and its dependence on time.

In the presence of 1% (w/v) Avicel and 1% (w/v) CM-Cellulose, maximum expression levels arise after 6 h of cultivation and increase by up to 4000- and 6400-fold, respectively. On the other hand, *Af-egl7* expression increases by 10-fold after 12 h of culture in β -glucan. Culture in xyloglucan does not affect endoglucanase induction.

The presence of SEB in the culture strongly induces *Af-egl7* at all times, up to 3000-fold, after 3, 6, and 12 h. This induction might represent a standard mechanism through which *A. fumigatus* acts when it is in contact with complex biomass. These results confirm that this endoglucanase has the potential to deconstruct SEB, as suggested by Gouvea et al. [15].

3.3. Heterologous expression and *Af-egl7* purification

We successfully expressed the recombinant *Af-egl7* under control of T7 RNA polymerase promoter in *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS. After expression with 1 mM IPTG at 37 °C for 4 h, we obtained the recombinant enzyme intracellularly as inclusion bodies (IB). After IB purification, the molecular weight was approximately 52 kDa. These data are consistent with our predictions, and the amino acids added to the protein sequence by the vector pET-28a(+) could explain why the molecular mass is slightly higher than the molecular mass we calculated (Fig. 3).

3.4. *Af-egl7* biochemical characterization

Fig. 4 depicts the effects of temperature and pH on *Af-egl7* stability and activity. *Af-egl7* is more active at 55 °C and retains 80% of the maximum activity at 60 °C (Fig. 4a). The optimal pH for *Af-egl7* is about 5.0, and the enzyme retains over 55% of its maximum activity at pH values ranging from 4.0 to 5.5 (Fig. 4b).

The optimal *Af-egl7* activity is comparable to the activity of other fungal GH7 endoglucanases, which have optimal activity at temperatures lower than 65 °C and at pH values ranging from 3.5 to 7.5 [38,40,41]. Endoglucanases (cel7) from *N. fischeri* and from *A. fumigatus* DBiNU-1 exhibit maximum activity at pH 5.0 and 60 °C [31,42],

Fig. 2. qRT-PCR. Gene *Af-egl7* expression levels after 3, 6, 12, and 24 h of *A. fumigatus* growth in the presence of 1% (w/v) SEB, 1% (w/v) xyloglucan, 1% (w/v) β-glucan, 1% (w/v) CM-Cellulose, and 1% (w/v) Avicel. The gene *Af-egl7* was considered to be induced in the biomass when the fold change result was higher than 1.0.

and the optimal temperature and pH for the endoglucanase from *A. fumigatus* ABK9 are 50 °C and 5.0, respectively [22].

We tested the Af-EGL7 thermostability from 30 to 80 °C. After 30 min at 30, 40, and 50 °C, the enzyme displays 100% residual activity, but no residual activity exists after 30 min at temperatures above 60 °C (Fig. 4c). Addition of 5 mM MnCl₂ or 5 mM L-cystein does not increase the Af-EGL7 thermostability (data not show).

We also analyzed the thermostability over 48 h of incubation. Af-EGL7 is more stable at 50 °C than at 55 °C: the enzyme retains more than 85% of its activity after incubation at 50 °C for 48 h, whereas it retains 50% of its activity after 30 min at 55 °C (Fig. 4d). The main reason for these results is that substrate binding stabilizes the enzyme,

and the absence of substrate during incubation culminates in Af-EGL7 not being stable for long at 55 °C [43]. Finally, Af-EGL7 retains 100% of its maximum activity after incubation at 4 °C for 30 days.

Liu et al. [31] demonstrated that Cel7A retains 100 and 16% of its initial activity after incubation at 60 and 70 °C for 1 h, respectively. The discrepancies in the thermostability of Cel7A and Af-EGL7 may be due to CelA glycosylation during its expression in *P. pastoris* [44,45].

We measured Af-EGL7 stability at different pH by incubating the enzyme in McIlvaine buffers pH 3.0–8.0 at 4 °C for 24 h. The enzyme is highly stable at pH 3.0 (96%), 4.0 (100%), 5.0 (100%), and 6.0 (90%), but it loses its activity above pH 7.0 (38%) (Fig. 4e).

The purified enzyme exhibits higher stability under acidic pH,

Fig. 3. Purified recombinant Af-EGL7 SDS-PAGE analysis. Lane M: Molecular weight marker (Precision™ Protein Standards Dual Color – BioRad). Lane 1: Cell extract obtained after 0 h of induction. Lane 2: Cell extract obtained after 4 h of induction. Lanes 3, 4, 5, 6, 7, and 8: Supernatants obtained during purification of inclusion bodies. Lane 9: Purified recombinant Af-EGL7.

Fig. 4. Optimal conditions for AF-EGL7 activity and stability. A) Temperature curve; B) pH curve; C) Thermal stability; D) Stability at 50 and 55 °C. Closed circles and closed triangles represent 50 and 55 °C, respectively; E) pH stability.

which is significant in view of their potential industrial applications because industrial process used to produce sugars for biofuel production, usually for instance [46].

3.5. Effect of different metal ions and chemicals

Table 1 depicts how different ions and reagents influence CM-Celulose hydrolysis by purified Af-EGL7. At 5 mM, MnCl_2 (232.9%), DTT (165.2%), CoCl_2 (161.1%), L-cystein (152.2%), CaCl_2 (135.7%), β -

Table 1
Effect of metal ions, salts and chemicals on the activity of purified recombinant Af-EGL7.

Additive	Relative activity (%)	Additive	Relative activity (%)
None	100.0 ± 0.2	ZnSO ₄	79.6 ± 0.3
MnCl ₂	232.9 ± 3.1	CuSO ₄	67.6 ± 0.6
CoCl ₂	161.1 ± 1.7	AgNO ₃	0
CaCl ₂	135.7 ± 0.2	DTT	165.2 ± 0.8
FeSO ₄	128.1 ± 0.9	L-cysteine	152.2 ± 1.2
MgSO ₄	122.6 ± 4.6	β-mercaptoethanol	132.1 ± 2.3
NiSO ₄	114.2 ± 0.2	DMSO	111.5 ± 1.7
NaCl	113.2 ± 1.4	EDTA	108.1 ± 0.6
KCl	110.4 ± 0.0	Tween 20	106.2 ± 0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	105.5 ± 0.2	SDS	0

mercaptoethanol (132.1%), FeSO₄ (128.1%), and MgSO₄ (122.6%) highly stimulate Af-EGL7 activity. Likewise, the monovalent cations Na⁺ and K⁺ enhance Af-EGL7 activity by 113.2 and 110.4%, respectively.

EDTA, Tween 20, and (NH₄)₂SO₄ affect Af-EGL7 activity very little: 108.1, 106.2, and 105.5%, respectively. On the other hand, ZnSO₄ (79.6%) and CuSO₄ (67.6%) partially reduce Af-EGL7 activity, whilst SDS and AgNO₃ completely inhibit the enzyme.

We also investigated the effect of different MnCl₂ concentration on the activity of purified endoglucanase Af-EGL7 (Table 2). Af-EGL7 activity increases gradually with increasing effector concentration up to 5 mM; a saturating condition emerges above 10 mM. Mn²⁺ enhances Af-EGL7 activity and may act by improving the substrate binding affinity and by stabilizing the catalytic site conformation [40,47–49]. Similarly, the fact that β-mercaptoethanol, DTT, and L-cysteine boost Af-EGL7 activity suggests that the presence of sulfhydryl groups like cysteine in the active site is important for catalysis [48].

The small EDTA effect on Af-EGL7 activity indicates that Af-EGL7 is not a metalloenzyme. Complete Af-EGL7 inhibition by AgNO₃ is due to the strong binding affinity of Ag⁺ ions for reduced sulfhydryl groups, which inhibits enzymatic activity irreversibly [48,50].

The higher Af-EGL7 activity in the presence of metal cations and chemical reagents (MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, FeSO₄, MgSO₄, NiSO₄, NaCl, DTT, and β-mercaptoethanol) as compared to CEL7A activities [31] highlights the difference between both enzymes once again and suggest some important industrial features for Af-EGL7.

3.6. Af-EGL7 substrate specificity and kinetics

We analyzed the Af-EGL7 mode of action against different substrates (Table 3). Like most GH7, the enzyme displays higher activity toward barley β-glucan (817% as compared to CM-Cellulose), which suggests a β-1,3-1,4-glucanase activity [31,35,40]. The relative Af-EGL7 activity toward xyloglucan is 334%, but this enzyme is not active toward beech wood xylan or Avicel, which indicates that Af-EGL7 does not act as an exocellulase [48,51].

One of the important biotechnological characteristics of Af-EGL7 is that it can hydrolyze a wide variety of substrates, such as β-glucan, xyloglucan, and CMC. This may be due to its well-adapted structure, which also allows hydrolysis of plant cell wall polysaccharides.

We also examined the ability of purified Af-EGL7 to hydrolyze CM-Cellulose and barley β-glucan incorporated into gel. The zymogram analyses showed that the enzyme breaks down both substrates, creating a clear zone in the gel after de-staining (Fig. 5).

Table 2
Effect of different Mn²⁺ concentrations on Af-EGL7 activity.

mM	0	0.1	0.5	1	5	10	20
Relative activity (%)	100.0 ± 0.2	113.4 ± 1.8	144.1 ± 5.9	174.2 ± 2.8	223.9 ± 1.2	209.6 ± 2.8	73.3 ± 6.4

Table 3
Relative activity of Af-EGL7 on different substrates.

Substrate	Relative activity (%)
Low viscosity CMC	100.0 ± 4.7
Medium viscosity barley β-glucan	817.1 ± 1.8
Xyloglucan from tamarind seed	334.0 ± 17.4
Avicel [®] PH-101	ND
Beechwood xylan	ND

ND: not detected.

We determined the Af-EGL7 kinetic parameters when CM-Cellulose or barley β-glucan were the substrates. When barley β-glucan was the substrate, K_M and V_{max} were 113.9 mg mL⁻¹ ± 0.0046 and of 191.9 U mg⁻¹ ± 0.0007, respectively. When CMC was the substrate, K_M was 209.7 ± 0.1356 mg mL⁻¹ and V_{max} was lower as compared to barley β-glucan (51.98 ± 0.0069 U mg⁻¹). The catalytic efficiency of Af-EGL7 toward barley β-glucan was 6.8-fold of that to CMC (Table 4).

3.7. Enzyme performance on pretreated biomass

In Brazil, large volumes of sugarcane straw and bagasse are generated as agricultural residue. Such biomass is considered an important source of renewable energy [52] and is an interesting substrate to produce chemicals and fuels (2G bioethanol). However, the recalcitrant cell wall of this biomass calls for enzymatic conversion of cell wall polysaccharides into fermentable sugars, which is a difficult and costly process [53]. New hydrolytic enzymes could be a good strategy to overcome these disadvantages and to obtain products from hydrolyses at low cost [54,55].

Considering that lignocellulosic biomass saccharification is commonly conducted between 45 and 50 °C and at pH values ranging from 4.5 to 5.0 [46], we assessed Af-EGL7 efficiency in biomass saccharification by accomplishing performance assays on sugarcane exploded bagasse biomass (SEB). SEB is a highly heterogeneous material that consists of 47.5% cellulose, 9.0% hemicellulose, and 34.3% lignin [15].

For this purpose, we incubated Af-EGL7 together with Celluclast[®] 1.5 L at pH 5.0 and 50 °C and monitored the release of soluble sugars for 72 h (Fig. 6). After 24 h, the yield of reducing sugars was 2.3-fold higher as compared to the control without Af-EGL7 after 24 h ($p < 0.05$). We did not detect any reducing sugars after hydrolysis for 6 h.

Our results showed that Af-EGL7 does improve SEB hydrolysis by enzyme cocktails. Therefore, this enzyme could be used in biotechnological industries and be a potential supplement in enzyme cocktails for the hydrolysis of sugarcane bagasse [46].

In summary, Af-EGL7 has excellent properties, including good thermal and pH stability, high tolerance to ions and metals, and significant effect on sugarcane breakdown, which make it a good candidate for application in biotechnological industries.

4. Conclusions

Initially, we cloned, overexpressed, and purified the endoglucanase from *A. fumigatus*. Next, we explored the Af-EGL7 biochemical properties in detail. We found that Af-EGL7 can be a useful supplement in commercial enzyme cocktails for saccharification of exploded sugarcane bagasse (SEB) and has the potential to improve current enzyme cocktails.

Fig. 5. SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and Zymogram gels of purified Af-EGl7. Zymogram analyses were performed with A) 1% (w/v) CM-Cellulose and B) 1% (w/v) β -glucan. Lane M: Molecular weight marker (Precision™ Protein Standards Dual Color – BioRad). Lane 1: Purified recombinant Af-EGl7.

Table 4

Kinetic parameters for Af-EGl7 in the presence of 5 mM Mn^{2+} .

Substrate	K_M (mg mL ⁻¹)	V_{max} (μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL mg ⁻¹ s ⁻¹)
CMC	209.7 $\pm$ 0.1356	51.98 $\pm$ 0.0069	43.32	0.207
β -glucan	113.9 $\pm$ 0.0046	191.9 $\pm$ 0.0007	159.9	1.404

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author's contributions

AVB conceived and designed the experiments, data analyses, preparation of figures/tables and offered intellectual contributions. PFG and LEG offered intellectual contributions. DKY performed thermostability experiments. LLLB and SAU offered intellectual contributions at various stages of this work and provided critical reviews of the manuscript. TMD participated in the design and coordination of the study, wrote the manuscript, and conducted the final analysis of the data. All the authors have read and approved the final manuscript.

Fig. 6. Synergistic activities of Af-EGl7 during SEB hydrolysis. SEB (1% w/v) was hydrolyzed by using Celluclast 1.5L (0.9 FPU/g SEB) without (control) or with Af-EGl7 (500 μ g) in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 50 °C for 72 h. The reducing sugars were determined by the DNS assay, and yield of reducing sugars were expressed as % of the theoretical maximum yield of glucose. The data represent means $\pm$ standard errors obtained from the four experimental replicates.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2014/10466-0 and FAPESP, 2016/19095-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq: 425465/2016-0). AVB, PFG, and LEG were funded by scholarships granted by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2018.04.016>.

References

- [1] G. Ramani, B. Meera, C. Vanitha, J. Rajendran, P. Gunasekaran, Molecular cloning and expression of thermostable glucose-tolerant β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 in *Pichia pastoris* and its characterization, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42 (2015) 553–565, <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1549-6>.
- [2] G.M. Souza, R.L. Victoria, C.A. Joly, L.M. Verdade, Bioenergy and sustainability: bridging the gaps, *SCOPE Briefing* (2015) 4, <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [3] J. Strakowska, L. Błaszczyk, J. Chelkowski, The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus, *J. Basic Microbiol.* 54 (2014), <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201300821>.
- [4] S. Haghighi Mood, A. Hossein Golestan, M. Tabatabaei, G. Salehi Jouzani, G.H. Najafi, M. Gholami, M. Ardjmand, Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27 (2013) 77–93, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>.
- [5] V. Arantes, J.N. Saddler, Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis, *Biotechnol. Biofuels* 3 (2010) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-3-1>.
- [6] F. Segato, B. Dias, G.L. Berto, D.M. de Oliveira, F.H.M. De Souza, A.P. Citadini, M.T. Murakami, A.R.L. Damásio, F.M. Squina, I. Polikarpov, Cloning, heterologous expression and biochemical characterization of a non-specific endoglucanase family 12 from *Aspergillus terreus* NH2624, *Biochim. Biophys. Acta Protein Proteomics* 1865 (2017) 395–403, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.003>.
- [7] D. Liu, R. Zhang, X. Yang, Y. Xu, Z. Tang, W. Tian, Q. Shen, Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost, *Protein Expr. Purif.* 79 (2011) 176–186, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.008>.
- [8] J. Yan, W. Liu, Y. Li, H.L. Lai, Y. Zheng, J.W. Huang, C.C. Chen, Y. Chen, J. Jin, H. Li, R.T. Guo, Functional and structural analysis of *Pichia pastoris*-expressed *Aspergillus Niger* 1,4- β -endoglucanase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 475 (2016) 8–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.012>.
- [9] X. mei Huang, Q. qing Li, X. ling Chen, J. xia Fan, X. hong Xu, X. dong Sun, D. yu Li, H. xiao Zhao, Expression and characteristics of an endoglucanase from *Trichoderma atroviride* (TaEGII) in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 182 (2017) 1158–1170, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2389-9>.
- [10] G.P. Borin, C.C. Sanchez, E. de Santana, G.K. Zanini, R.A.C. dos Santos, A. de Oliveira Pontes, A.T. de Souza, R.M.M.T.S. Dal'Mas, D.M. Rialho-Pachón, G.H. Goldman, J.V. de C. Oliveira, Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus Niger* and *Trichoderma reesei*, *BMC Genom.* 18 (2017), <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-3857-5>.
- [11] G.P. Borin, C.C. Sanchez, A.P. de Souza, E.S. de Santana, A.T. de Souza, A.F.P. Leme, F.M. Squina, M. Buckeridge, G.H. Goldman, J.V. de Castro Oliveira, Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus Niger* during growth on sugarcane biomass, *PLoS One* 10 (2015), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0129275>.
- [12] A.R.L. Damasio, M.V. Rubio, T.A. Gonçalves, G.F. Persinoti, F. Segato, R.A. Prade, F.J. Contesini, A.P. de Souza, M.S. Buckeridge, F.M. Squina, Xyloglucan breakdown by endo-xyloglucanase family 74 from *Aspergillus fumigatus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 2893–2903, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-8014-6>.
- [13] R.K. Sharma, D.S. Arora, Fungal degradation of lignocellulosic residues: an aspect of improved nutritive quality, *Crit. Rev. Microbiol.* 41 (2015) 52–60, <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2013.791247>.
- [14] N.L. Glass, M. Schmoll, J.H.D. Cate, S. Coradetti, Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi, *Annu. Rev. Microbiol.* 67 (2013) 477–498, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>.
- [15] P.F. de Gouvêa, A.V. Bernardi, L.E. Gerolamo, E.S. Santos, D. Riano-Pachón, S.A. Uyemura, T.M. Dinamarco, Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse, *BMC Genom.* 19 (2018) 1–18, <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-4627-8>.
- [16] N. Srivastava, M. Srivastava, P.K. Mishra, P.W. Ramteke, Application of ZnO nanoparticles for improving the thermal and pH stability of crude cellulase obtained from *Aspergillus fumigatus* AA001, *Front. Microbiol.* 7 (2016), <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00514>.
- [17] H. Culleton, V. Mckie, R.P. De Vries, Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: what have we learned from *Aspergillus*? *Biotechnol. J.* 8 (2013) 884–894, <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201200382>.
- [18] J. Van Den Brink, R.P. De Vries, Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011) 1477–1492, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2>.
- [19] P. Sharma Ghimire, H. Ouyang, Q. Wang, Y. Luo, B. Shi, J. Yang, Y. Lü, C. Jin, Insight into enzymatic degradation of corn, wheat, and soybean cell wall cellulose using quantitative secretome analysis of *Aspergillus fumigatus*, *J. Proteome Res.* 15 (2016) 4387–4402, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00465>.
- [20] S.S. Adav, A. Ravindran, S.K. Sze, Quantitative proteomic study of *Aspergillus fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes, *J. Proteomics* 119 (2015) 154–168, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.007>.
- [21] F. Segato, G.L. Berto, E. Ares de Araújo, J.R. Muniz, I. Polikarpov, Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Aspergillus terreus* endo- β -1,4-glucanase from glycoside hydrolase family 12, *Acta Crystallogr. F, Struct. Biol. Commun.* 70 (2014) 267–270, <http://dx.doi.org/10.1107/S2053230X13034936>.
- [22] A. Das, A. Jana, T. Paul, S.K. Halder, K. Ghosh, C. Maity, P.K. Das Mahapatra, B.R. Pati, K.C. Mondal, Thermodynamics and kinetic properties of halostable endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* ABK9, *J. Basic Microbiol.* 54 (2014), <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201300350>.
- [23] R. Maheshwari, G. Bharadwaj, M.K. Bhat, Thermophilic fungi: their physiology and enzymes, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 461–488, <http://dx.doi.org/10.1228/MMBR.64.3.461-488.2000>.
- [24] R.M. Yennamalli, A.J. Rader, A.J. Kenny, J.D. Wolt, T.Z. Sen, Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications, *Biotechnol. Biofuels* 6 (2013), <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-136>.
- [25] A.L. Grigorevski-Lima, F.N.M. Da Vinha, D.T. Souza, A.S.R. Bispo, E.P.S. Bon, R.R.R. Coelho, R.P. Nascimento, *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, pp. 321–329, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8482-y>.
- [26] C.P. Semighini, M. Marins, M.H.S. Goldman, G.H. Goldman, Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 1351–1357, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.3.1351-1357.2002>.
- [27] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428, <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- [28] B.Y. David, The Colorimetric Determination Serum Proteins, (1929), pp. 545–550.
- [29] T.C. McIlvaine, A buffer solution for colorimetric comparison, *J. Biol. Chem.* 49 (1921) 183–186, <http://dx.doi.org/10.1007/s13398-014-0173-2>.
- [30] B.C. Bussamra, S. Freitas, A.C. da Costa, Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail, *Bioresour. Technol.* 187 (2015) 173–181, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.117>.
- [31] Y. Liu, B. Dun, P. Shi, R. Ma, H. Luo, Y. Bai, X. Xie, B. Yao, A novel GH7 Endo- β -1,4-glucanase from *Neosartorya fischeri* P1 with good thermostability, broad substrate specificity and potential application in the brewing industry, *PLoS One* 10 (2015), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137485>.
- [32] A.B. Boraston, D.N. Bolam, H.J. Gilbert, G.J. Davies, Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition, *Biochem. J.* 382 (2004) 769–781, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040892>.
- [33] H.A. Chokhawala, C.M. Roche, T.W. Kim, M.E. Atreya, N. Vegesna, C.M. Dana, H.W. Blanch, D.S. Clark, Mutagenesis of *Trichoderma reesei* endoglucanase I: impact of expression host on activity and stability at elevated temperatures, *BMC Biotechnol.* 15 (2015), <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-015-0118-z>.
- [34] G. Carrard, A. Koivula, H. Soderlund, P. Beguin, Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 97 (2000) 10342–10347, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.160216697>.
- [35] A.C. Karnaouri, E. Topakas, P. Christakopoulos, Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* capable of high-consistency enzymatic liquefaction, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 231–242, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-4895-9>.
- [36] G.J. Kleywegt, J.Y. Zou, C. Divne, G.J. Davies, I. Sinning, J. Ståhlberg, T. Reinikainen, M. Srisoduk, T.T. Teeri, T. A. Jones, The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes, *J. Mol. Biol.* 272 (1997) 383–397, <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1997.1243>.
- [37] V.O.A. Pellegrini, V.I. Serpa, A.S. Godoy, C.M. Camilo, A. Bernardes, C.A. Rezende, N.P. Junior, J.P.L. Franco Cairo, F.M. Squina, I. Polikarpov, Recombinant *Trichoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 9591–9604, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6772-1>.
- [38] K. Wang, H. Luo, P. Shi, H. Huang, Y. Bai, B. Yao, A highly-active endo-1,3-1,4- β -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394.64 with application potential in the brewing and feed industries, *Process Biochem.* 49 (2014) 1448–1456, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.003>.
- [39] X. Chang, B. Xu, Y. Bai, H. Luo, R. Ma, P. Shi, B. Yao, Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*, *PLoS One* 12 (2017), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0171111>.
- [40] S. Aich, R.K. Singh, P. Kundu, S.P. Pandey, S. Datta, Genome-wide characterization of cellulases from the hemi-biotrophic plant pathogen, *Bipolaris sorokiniana*, reveals the presence of a highly stable GH7 endoglucanase, *Biotechnol. Biofuels* 10 (2017), <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-017-0822-0>.
- [41] C.M. Payne, B.C. Knott, H.B. Mayes, H. Hansson, M.E. Himmel, M. Sandgren, J. Ståhlberg, G.T. Beckham, Fungal cellulases, *Chem. Rev.* 115 (2015) 1308–1448, <http://dx.doi.org/10.1021/cr500351c>.
- [42] B. Rungtattanakasin, S. Premjet, S. Thanonkeo, P. Klanrit, P. Thanonkeo, Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DBNU-1 in *Kluyveromyces fragilis*, *Braz. J. Microbiol.* (2018) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.10.001>.

- [43] S.K. Ang, E.M. Shaza, Y.A. Adibah, A.A. Suraini, M.S. Madihah, Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation, *Process Biochem.* 48 (2013) 1293–1302, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>.
- [44] R. Daly, M.T.W. Hearn, Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production, *J. Mol. Recogn.* 18 (2005) 119–138, <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.687>.
- [45] A. Amore, B.C. Knott, N.T. Supekar, A. Shajahan, P. Azadi, P. Zhao, L. Wells, J.G. Linger, S.E. Hobdey, T.A. Vander Wall, T. Shollenberger, J.M. Yarbrough, Z. Tan, M.F. Crowley, M.E. Himmel, S.R. Decker, G.T. Beckham, L.E. Taylor, Distinct roles of N- and O-glycans in cellulase activity and stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 114 (2017) 13667–13672, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1714249114>.
- [46] S.H. Mohd Azhar, R. Abdulla, S.A. Jambo, H. Marbawi, J.A. Gansau, A.A. Mohd Faik, K.F. Rodrigues, Yeasts in sustainable bioethanol production: a review, *Biochem. Biophys. Rep.* 10 (2017) 52–61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>.
- [47] Y.M. Tao, X.Z. Zhu, J.Z. Huang, S.J. Ma, X.B. Wu, M.N. Long, Q.X. Chen, Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6126–6130, <http://dx.doi.org/10.1021/jf1003896>.
- [48] L.P. Meleiro, S. Carli, R. Fonseca-Maldonado, M. da Silva Torricillas, A.L.R.L. Zimbardi, R.J. Ward, J.A. Jorge, R.P.M. Furriel, Overexpression of a cellobiose-glucose-halotolerant endoglucanase from *scytalidium thermophilum*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2017) 1–18, <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-017-2660-8>.
- [49] J. Wang, L. Kang, Z. Liu, S. Yuan, Gene cloning, heterologous expression and characterization of a *Coprinopsis cinerea* endo- β -1,3(4)-glucanase, *Fungal Biol.* 121 (2017) 61–68, <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.09.003>.
- [50] M. Narra, G. Dixit, J. Divecha, K. Kumar, D. Madamwar, A.R. Shah, Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 88 (2014) 150–161, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.016>.
- [51] G.S. Naika, P. Kaul, V. Prakash, Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7566–7572, <http://dx.doi.org/10.1021/jf070710p>.
- [52] T.L. Bezerra, A.J. Ragauskas, A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production, *Biofuels Bioprod. Biorefining* 10 (2016) 634–647, <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.1662>.
- [53] T.H.F. Costa, M.E. Vega-Sánchez, A.M.F. Milagres, H.V. Scheller, A. Ferraz, Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance, *Biotechnol. Biofuels* 9 (2016), <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-016-0513-2>.
- [54] T.R. Dutra, V.M. Guimarães, E.M. Varela, L. Da Silva Fialho, A.M.F. Milagres, D.L. Falkoski, J.C. Zanuncio, S.T. De Rezende, A *Chrysosporthe cubensis* enzyme cocktail produced from a low-cost carbon source with high biomass hydrolysis efficiency, *Sci. Rep.* 7 (2017), <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-04262-y>.
- [55] F. Valadares, T.A. Gonçalves, D.S.P.O. Gonçalves, F. Segato, E. Romanel, A.M.F. Milagres, F.M. Squina, A. Ferraz, Exploring glycoside hydrolases and accessory proteins from wood decay fungi to enhance sugarcane bagasse saccharification, *Biotechnol. Biofuels* 9 (2016), <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-016-0525-y>.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse

Paula Fagundes de Gouvêa^{1†}, Aline Vianna Bernardi^{1†}, Luis Eduardo Gerolamo¹, Emerson de Souza Santos², Diego Mauricio Riaño-Pachón^{3,4}, Sergio Akira Uyemura² and Taisa Magnani Dinamarco^{1*}

Abstract

Background: Sugarcane bagasse has been proposed as a lignocellulosic residue for second-generation ethanol (2G) produced by breaking down biomass into fermentable sugars. The enzymatic cocktails for biomass degradation are mostly produced by fungi, but low cost and high efficiency can consolidate 2G technologies. *A. fumigatus* plays an important role in plant biomass degradation capabilities and recycling. To gain more insight into the divergence in gene expression during steam-exploded bagasse (SEB) breakdown, this study profiled the transcriptome of *A. fumigatus* by RNA sequencing to compare transcriptional profiles of *A. fumigatus* grown on media containing SEB or fructose as the sole carbon source. Secretome analysis was also performed using SDS-PAGE and LC-MS/MS.

Results: The maximum activities of cellulases (0.032 U mL⁻¹), endo-1,4-β-xylanase (10.82 U mL⁻¹) and endo-1,3-β-glucanases (0.77 U mL⁻¹) showed that functional CAZymes (carbohydrate-active enzymes) were secreted in the SEB culture conditions. Correlations between transcriptome and secretome data identified several CAZymes in *A. fumigatus*. Particular attention was given to CAZymes related to lignocellulose degradation and sugar transporters. Genes encoding glycoside hydrolase classes commonly expressed during the breakdown of cellulose, such as GH-5, 6, 7, 43, 45, and hemicellulose, such as GH-2, 10, 11, 30, 43, were found to be highly expressed in SEB conditions. Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMO) classified as auxiliary activity families AA9 (GH61), CE (1, 4, 8, 15, 16), PL (1, 3, 4, 20) and GT (1, 2, 4, 8, 20, 35, 48) were also differentially expressed in this condition. Similarly, the most important enzymes related to biomass degradation, including endoxylanases, xyloglucanases, β-xylosidases, LPMOs, α-arabinofuranosidases, cellobiohydrolases, endoglucanases and β-glucosidases, were also identified in the secretome.

Conclusions: This is the first report of a transcriptome and secretome experiment of *Aspergillus fumigatus* in the degradation of pretreated sugarcane bagasse. The results suggest that this strain employs important strategies for this complex degradation process. It was possible to identify a set of genes and proteins that might be applied in several biotechnology fields. This knowledge can be exploited for the improvement of 2G ethanol production by the rational design of enzymatic cocktails.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, Sugarcane bagasse, CAZymes, Lignocellulose breakdown, RNA-Seq, Secretome

* Correspondence: tdinamarco@fclrp.usp.br

[†]Equal contributors

¹Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto, Chemistry Department, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The demand for energy has increased continuously worldwide, which has raised concerns about sustainability and has prompted the search and development of advanced renewable and sustainable sources of energy [1]. Bioethanol has been noted as an alternative fuel to tackle these issues [1–3]. In Brazil, ethanol production relies on the fermentation of sucrose from sugarcane to yield the so-called first-generation (1G) bioethanol [4, 5]. The current Brazilian production is estimated at 30 billion liters per year, but the growing appeal of this fuel has called for investments in the development of new technologies to produce ethanol [6]. Large amounts of sugarcane straw and bagasse are generated every year in Brazil, so this biomass could be used as a substrate to produce 2G bioethanol, which in a few years will compete with 1G ethanol costs [6–11].

Lignocellulose is the most abundant material in nature. It consists of three major polymers: cellulose, hemicellulose and lignin. Cellulose, the main polymeric component of plant biomass, usually contains regions that are highly crystalline. It is a linear polymeric chain of over 10,000 D-glucose residues linked by β -1,4-glycosidic bonds [12–14]. The degradation of lignocellulose into fermentable sugars require many types of enzymes, e.g., β -glucosidases, cellobiohydrolases, endoglucanases, β -xylosidases, endo- β -1,4-xylanases, and numerous other auxiliary enzymes [5, 12, 15]. Due its recalcitrant characteristic, lignocellulose is difficult to degrade, even when enzymes work synergistically [12, 16].

Filamentous fungi such as *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* play an important role in the secretion of enzymes known as CAZymes (carbohydrate-active enzymes), which can act synergistically and are the main source of enzymatic cocktails. Several studies have been conducted to optimize the current enzymatic cocktails and to reduce costs involved in 2G ethanol production [4, 12, 17–19]. The *Aspergillus* genus comprises over 250 species and has received much attention due numerous species secreting hydrolytic enzymes of interest to lignocellulosic biorefineries. *A. fumigatus* is an opportunistic and pathogenic fungus, and depending on immunological status of host, can lead to a variety of allergic reactions. However is an important producer of lignocellulolytic enzymes that act synergistically to increase the efficiency of the secreted enzymes. In addition, this fungus secretes thermostable glycosyl hydrolases, such as β -glucosidases (EC 3.2.1.21), endoglucanases (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolases (EC 3.2.1.9), xylosidases (EC 3.2.1.37) and endoxylanases (EC 3.2.1.32), which can withstand elevated temperatures [20–23].

Previously, specific cellulose-, hemicellulose-, pectin-, and lignin-degrading enzymes were identified as secreted by *A. fumigatus* in the presence of different carbon

sources (Avicel, cellulose, rice straw, starch, xylan, corn and soybean) that can be used in the lignocellulosic bioenergy industry [22, 24–26]. To gain more insight into how efficiently *A. fumigatus* AF293 can depolymerize the sugarcane bagasse, a complex biomass important for Brazilian 2G ethanol production, and to identify genes and proteins responsible for these lignocellulosic breakdown reactions, we examined the transcriptional response by RNA-Seq and proteomic profile by mass spectrometry (LC-MS/MS) of *A. fumigatus* that was cultivated in the presence of steam-exploded sugarcane bagasse (SEB).

Methods

Strains, media, and growth conditions

A. fumigatus AF293, gently donated by the Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura (University of São Paulo, BR), was grown on YAG medium (2% (w/v) dextrose, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.1% (v/v) trace elements and 1.8% (w/v) agar) at 37 °C for two days. Spores were harvested and inoculated to a final concentration of 1×10^8 per 50 mL of YNB culture with 1% (w/v) fructose as the carbon source at 37 °C for 16 h (h) in a rotary shaker with agitation at 200 rpm. Afterward, the mycelia were transferred to 1% (w/v) SEB (47.5% cellulose; 9.0% hemicellulose and 34.3% lignin) or 1% (w/v) fructose as the carbon source for 3, 6, 12, 18, 24, 48 and 72 h. Fructose was used as a control in all experimental conditions [26]. Mycelia were harvested by filtration through Whatman grade 1 filters (GE Healthcare, Grandview Blvd. Waukesha, WI, USA), washed once with sterile cool water and kept at -80 °C until RNA extraction. Supernatants were collected to measure enzymatic activity and determine the secretome. All the experiments described below were performed in three biological replicates.

Enzymatic activity assays

Specific xylanase (endo-1,4- β -xylanase) and cellulase (endo-1,4- β -glucanase) activities were performed with Azo-Xylan (Birchwood) and Azo-CM-Cellulose (both from Megazyme International, Bray, Ireland) as substrates, respectively, according to the manufacturer's protocols. The enzymatic activities are represented as U mL⁻¹. All the reactions were performed in triplicate. The software Mega-Calculator (Megazyme International) was used to determine the enzymatic activities.

Enzymatic activities were also measured by the dinutrosalicylic acid (DNS) assay [27]. Cellulase activities were measured with β -glucan and low-viscosity carboxymethylcellulose (CMC) as substrates, and xylanase activities were measured with the xyloglucan. Briefly, 20 μ L of the supernatant from the samples grown in presence of 1% SEB for 24, 48 and 72 h were mixed with 30 μ L of sodium acetate buffer 100 mM (pH 5.5) and 50 μ L of

substrate at 0.5% (*w/v*) final concentration to achieve a final volume of 100 μ L. The reactions were incubated at 40 °C for 5 min for β -glucan and for 10 min for xyloglucan and CMC substrates. The reaction was stopped by adding 100 μ L of DNS. All the reactions were performed in triplicate. The calculation of enzyme activities was based on a corresponding standard containing glucose. One unit (U) of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme needed to liberate 1 μ mol of reducing sugars per minute.

RNA isolation and cDNA synthesis

Fungal biomass was harvested at different times from SEB or fructose culture conditions, and mycelia were ground in liquid nitrogen using a mortar and pestle. Total RNA was purified by using the “Direct-zol” RNA MiniPrep” kit according to the manufacturer’s instructions (Zymo Research, Irvine, CA, EUA) using the on-column DNase treatment. RNA integrity was confirmed with a bioanalyzer by using the “Agilent RNA 6000 Nano” kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) and the “Plant Total RNA Nano” protocol. RNA was quantified on a Qubit® 2.0 fluorimeter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EUA) with the Qubit® RNA BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EUA). cDNA was synthesized from 1 μ g of mRNA using SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Library preparation and RNA sequencing

RNA sequencing libraries were prepared using the “TruSeq Stranded mRNA HT Sample Prep” kit (Illumina, San Diego, CA, EUA), mRNA enrichment was performed using magnetic beads coupled with oligo (dT). Sequencing was carried out in the HiSeq 2500 system (Illumina, San Diego, CA, EUA) at the NGS facility located at the Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Campinas, SP, Brazil.

Bioinformatic analysis of RNA-Seq data

FastQC [28] was used to check the quality of the sequencing reads visually. Removal of the remaining adapter sequences and quality trimming with a sliding window of size 4, minimum quality of 20, and length filtering (to keep reads with a length of at least 60 bp) were performed with Trimmomatic v0.32, [29]. Clean reads were screened against a database of ribosomal RNA with the aid of SortMeRNA [30]. High-quality reads were mapped in a strand-specific manner by using TopHat2 [31] against the genome sequence of *A. fumigatus* Af293 obtained from ASPGD [32, 33]. The number of exon-exon junctions at different levels of read subsampling was employed to confirm sequencing saturation with RSeQC [34]. Mapping of the reads to the

features of the exons were summarized at the gene level by using the function featureCounts from the Rsubread v1.12.6 package [35] in R v3.0.2 [36] and the annotation file in GFF3 format from ASPGD. Differential gene expression was analyzed with edgeR [37] in R [36]. Briefly, genes with at least one CPM (counts per million) in at least three samples were kept for analysis, which was equivalent to removing genes with low and noisy expression. The expression values were normalized by the trimmed mean of M-values (TMM) method to account for differences in the composition of RNA [38]. After the dispersion was estimated and the biological coefficient of variation was computed, the differentially expressed genes were called by fitting a negative binomial model with generalized linear models (GLS) that included factors for the TMM and the dispersion estimates [37]. A likelihood ratio test was performed to provide a *p*-value for differential expression. The *p*-values were adjusted for multiple testing by the method of Benjamini-Hochberg, to control the false discovery rate (FDR) [39]. The full R script used for the analysis and the raw count matrix are available in Additional file 1: Figure S1 and Additional file 2: Table S1, respectively. Genes with FDR values lower than 0.05 and log2-fold changes greater than 1.0 or lower than −1.0, i.e., a difference of twice the expression level in either direction, were considered differentially expressed.

Supernatant analysis by SDS-PAGE

Supernatants (50 mL) from SEB or fructose culture conditions were lyophilized until completely dry and resuspended in 2 mL of buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8; 1 mM DTT; and 1 mM protease inhibitor), and 15 μ L was separated by 10% SDS-PAGE (110 V, 90 min). The proteins were visualized by staining with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R250 (*w/v*), which was followed by destaining with 45% methanol and 10% acetic acid solution (*v/v*). The protein concentration was determined by Bradford’s Assay (Bio-Rad Protein Assay Hercules, CA, EUA) [40]. Prior to mass spectrometry, all the bands from the SDS-PAGE gels were manually excised, reduced, alkylated, digested with trypsin, and purified (Promega, Madison, WI, EUA - V5111) according to a previously described method [41].

Identification of proteins by coupled system of the LC-MS/MS type

Peptides were sequenced on a Synapt G2 HDMS (Waters, Milford, MS, EUA) mass spectrometer coupled to a UPLC NanoAcquity system with 1D technology (Waters, Milford, MS, EUA) and captured by a C18 Symmetry column (5 μ m, 180 μ m $\times$ 20 mm) (Waters, Milford, MS, EUA). The peptides were separated by using a 2–90% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid and an HSS T3

analytical column (1.8 μm , 75 $\mu\text{m} \times 100$ mm) (Waters, Milford, MS, EUA) with a flow of 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ for 120 min. The data were acquired on a Waters Synapt G2S Q-TOF mass spectrometer equipped with a NanoLock-Spray (Waters, Milford, MS, EUA). The experiments were performed in the HDMSE mode (data-independent analysis). The mass spectra were processed with the ProteinLynxGlobalServer (PLGS) software version 3.1. The proteins were identified by comparison to the *Aspergillus* UNIPROT database (207,966 proteins) [42]. The defined parameters were automatic tolerance for precursors and ion products, minimum of three corresponding ion fragments per peptide, minimum of seven corresponding ion fragments per protein, trypsin missed cleavage, carbamidomethylation as a fixed modification, oxidation of methionine as a variable modification, and 4% FDR peptide.

Protein analysis

Protein sequences were analyzed with the BLAST (basic local alignment search tool) software (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The subcellular localization of proteins was predicted by YLoc (interpretable subcellular localization prediction) (abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi) [43], and the presence of signals due to peptides of the secreted proteins was predicted by SignalP v.4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [44]. Additionally, Secretome Pv2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) was used to define the proteins that were secreted by the non-classic pathway [45].

For CAZy enzyme identification, the proteins in the secretome were screened with a library of hidden Markov models by using HMMER3 [46] of carbohydrate-active enzymes obtained from dbCAN [47]. Hits were considered positive on the basis of the dbCAN recommendations.

qRT-PCR analysis

After RNA-Seq analysis, 4 DEGs (Differentially Expressed Genes) were selected, including sugar transporters and CAZymes, for qRT-PCR analysis. RNA was extracted and purified as previously described. cDNA was synthesized from 5 μg of RNA using SuperScript[®] II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Quantitative PCR (qPCR) analyses were performed according to Semighini et al. [48]. The abundance of the respective mRNAs was normalized using β -tubulin probes. The primers for the investigated genes are listed in Additional file 3: Table S2.

Functional enrichment

Genes identified as differentially expressed were analyzed by FunCat functional enrichment [49]. The CAZy proteins from the secretome were classified according to the GO-Slim classifications from the AspGD based on

the ontology “Molecular function” (GO Categorization Slim Mapper) [50].

Venn diagrams

The area-proportional Venn diagrams were drawn based on images generated with free online software [51].

Results

Enzymatic analysis

To evaluate the activity of enzymes produced by *A. fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse, we performed enzymatic assays using xyloglucan, β -glucan, and CMC as substrates. Specific endo-1,4- β -xylanase and endo-1,4- β -glucanase activities, were also investigated using Azo-Xylan (Birchwood) and Azo-CM-Cellulose (both from Megazyme International, Bray, Ireland), respectively. The enzymes from supernatants derived from *A. fumigatus* cultures were capable of hydrolyzing cellulose (CMC) and hemicelluloses (β -glucan and xylan), but no activities were detected in xyloglucans (Fig. 1a-b).

We observed that the activities depended on duration of growth, with maximum activities detected within

Fig. 1 Enzyme activity. Enzymatic activities (U mL⁻¹) of supernatants from *A. fumigatus* culture against different substrates after 24, 48 and 72 h growth on sugarcane bagasse. Each bar represents the mean and the standard deviation of values from three independent experiments. **a** Azo-xylan, β -glucan and xyloglucan; **b** 1% CMC and Azo-CMC

three days, except for endo-1,4- β -D-xylanase, with peak activity after two days culture and no activities detected prior to 24 h of incubation. Maximum activities of cellulases (0.032 U mL^{-1}), endo-1,4- β -xylanase (10.82 U mL^{-1}) and endo-1,3- β glucanases (0.77 U mL^{-1}) were detected for *A. fumigatus* while in *A. niger* (0.002 U mL^{-1} ; 2.3 U mL^{-1} and 0.4 U mL^{-1} , respectively) and *T. reesei* RUT-C30 (0.0039 U mL^{-1} , 0.4 U mL^{-1} and 0.1 U mL^{-1} , respectively) are described on the same biomass [4]. These results indicate that *A. fumigatus* is an excellent producer of an arsenal of hydrolytic enzymes, with activities superior to the hypercellulolytic strain *T. reesei* RUT30-C.

To gain more insight into the hydrolytic enzymes of *A. fumigatus* specific for sugarcane bagasse breakdown, we selected the cultivation of 24 h (when we detected enzyme activity) because we were interested in the initial process of SEB breakdown. In this time we determinate the transcriptome and the secretome responses of this strain.

Analysis of the transcriptome of *A. fumigatus* under the influence of sugarcane bagasse as the substrate

To identify potential new genes involved in SEB breakdown, we analyzed the transcriptome by RNA-Seq after 24 h of cultivation. After RNA sequencing, each sample generated approximately 14 to 16 million paired-end reads. RNAseq data were analysed by comparing the mycelium grown on SEB and that grown on fructose. We observed 2227 genes differentially expressed ($\text{FDR} < 0.05$, $|\log_2\text{FC}| > 1$) in SEB where 1181 were upregulated, while 1045 were upregulated in fructose conditions (downregulated in SEB) (Additional file 4: Table S3). Gene ontology (GO) and the functional catalogue (FunCat) classified the differentially expressed genes functionally in 18 different enriched categories [40]. Two significant categories among upregulated genes were Metabolic Processes (GO:0008152) and Protein Synthesis (GO:0006412) and in downregulated genes Metabolic Processes (GO:0008152) and Energy (GO:0006112) (Additional file 5: Table S4). Genes related to the regulation of C-compound and carbohydrate metabolic processes represent the two GO terms commonly enriched for both up- and downregulated genes in the SEB condition, including genes encoding carbohydrate-active enzymes (CAZymes) and transporters. Given the importance of CAZymes for the degradation of biomass, we directed our efforts toward a better understanding of the transcriptional profile of these enzymes and sugar transporters.

We found 197 differentially expressed CAZyme genes classified based on the CAZy database (<http://www.cazy.org>) [52]. Concerning the 566 CAZyme genes predicted in the *A. fumigatus* AF293 genome categorized into the

different classes (247 GHs, 105 GTs, 96 CEs, 59 AAs, 15 PLs, and 44 CBMs) (Additional file 6: Table S5), we concluded that 35% of CAZyme genes were differentially expressed in our data, which highlights the potential that a wide spectrum of hydrolytic enzymes were produced. However, glycosyl transferases appeared only in a very small percentage ($\sim 1\%$), suggesting a secondary role in polysaccharide degradation (Fig. 2a).

Among the 197 CAZymes differentially expressed, 135 genes were upregulated in SEB and 62 were downregulated in SEB (upregulated in fructose), classified into 67 and 41 families, respectively (Additional file 4: Table S3). The classes of upregulated genes were 40% glycoside hydrolases (GH), 10% carbohydrate esterases (CE), 7% carbohydrate-binding modules (CBM), 5% glycosyltransferases (GT), 5% auxiliary activities (AA) and 2% polysaccharide lyases (PL), while downregulated genes represented 11% GHs, 6% CEs, 1% CBMs, 8% GTs, 4% AAs, and 1% PLs.

For plant biomass degradation, many enzymes working synergistically are required for efficiency hydrolysis. For cellulose degradation, endoglucanases (EGs) catalyze the hydrolysis at random positions in less crystalline regions; cellobiohydrolases (CBHs) act on the reducing and non-reducing ends of the chains, releasing cellobiose, which is cleaved into glucose by β -glucosidases [53]. We observed a synergistic upregulation of endoglucanases (GH5, GH12, GH16 and CBM1), cellobiohydrolases (GH6 and GH7) and β -glucosidases (GH1 and GH3). In addition to the cellulose degradation enzymes, 32 genes involved in xylan hydrolysis were also upregulated, e.g., endoxylanases (GH10, GH11 and CBM1), xylosidases (GH3 and GH43) and acetylxylan esterases (CBM1, CE2, CE16) (Fig. 2b).

In addition, numerous other plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes were also upregulated as described in Additional file 4: Table S3. Among the DEGs, GH11 endo-1,4-beta xylanase ($\log_2\text{FC} = 10.39$) appeared highly expressed, as well as CBM1 endoglucanase ($\log_2\text{FC} = 9.57$), extracellular glycosyl hydrolase/cellulose CBM 1 ($\log_2\text{FC} = 9.35$) and AA9 endo-1,4-beta-glucanase ($\log_2\text{FC} = 9.21$ and 8.75) (Table 1). Genes encoding delignification enzymes, such as laccase (Afu2g17530), cellobiose dehydrogenase (Afu2g17620), catalase (Afu2g18030), putative FAD-dependent oxygenase (Afu6g12070), and oxidoreductase enzymes, were also upregulated. Similarly, pectate lyases – PL1 (Afu2g00760), amylases – GH13 (Afu2g03230), and carboxypeptidases (Afu3g07040 and Afu5g01200) were detected in this study (Additional file 4: Table S3).

Taken together, endoglucanases, cellobiohydrolases and beta-glucosidases were significantly upregulated, suggesting the cellulose degradation potential of this strain,

Table 1 Main CAZymes related to biomass deconstruction upregulated in *A. fumigatus* AF293 transcriptome

Gene ID	Gene Description	CAZy family	log ₂ FC	Peptide Signal	Predicted substrate
Afu3g03870	endo-1,4-beta-glucanase	AA9	9.21	Y	cellulose
Afu4g07850	endoglucanase	AA9	8.75	Y	cellulose
Afu2g00920	extracellular glycosyl hydrolase/cellulase	CBM1	9.35	Y	arabinoxylan
Afu3g00420	acetyl xylan esterase (Axe1)	CBM1	4.13	Y	xylan
Afu6g01800	endoglucanase	CBM1	9.57	Y	cellulose
Afu6g03280	swollenin	CBM1	7.51	Y	cellulose
Afu6g11600	endoglucanase	CBM1	8.11	Y	cellulose
Afu6g13610	endo-1,4-beta-xylanase	CBM1	9.20	Y	xylan
Afu7g06740	endoglucanase	CBM1	8.34	N	cellulose
Afu8g06570	acetyl xylan esterase	CBM1	7.57	Y	xylan
Afu8g06830	endoglucanase	CBM1	4.40	Y	cellulose, β -1,4-glucan
Afu2g00690	glucan 1,4-alpha-glucosidase	CBM20	2.94	Y	starch
Afu4g10140	glucoamylase	CBM20	1.14	N	starch
Afu8g02510	glycosyl hydrolase family 43 protein	CBM35	1.61	Y	xylan, pectin
Afu2g14530	esterase	CE1	2.16	Y	xylan
Afu7g02380	ferulic acid esterase (FaeA)	CE1	1.72	Y	xylan
Afu2g00510	cellulose-binding GDSL lipase/acylhydrolase	CE16	7.28	Y	xylan, mannan
Afu2g00630	cellulose-binding GDSL lipase/acylhydrolase	CE16	3.97	Y	xylan, mannan
Afu2g09380	cutinase	CE5	7.10	Y	cutin
Afu2g14420	cutinase	CE5	3.71	Y	cutin
Afu4g03210	cutinase	CE5	6.74	Y	cutin
Afu1g14710	beta-glucosidase	GH1	3.42	N	cellulose
Afu3g15210	endo-1,4-beta-xylanase	GH10	8.59	Y	xylan
Afu4g09480	extracellular endo-1,4-beta-xylanase	GH10	8.82	Y	xylan
Afu3g00320	endo-1,4-beta-xylanase (XlnA)	GH11	10.39	Y	xylan
Afu3g00470	endo-1,4-beta-xylanase	GH11	8.64	Y	xylan
Afu6g12210	endo-1,4-beta-xylanase (XynG1)	GH11	6.91	Y	xylan
Afu7g06150	endoglucanase	GH12	8.58	Y	cellulose
Afu3g02090	beta-xylosidase	GH3	4.17	Y	xylan
Afu4g13770	glycosyl hydrolase	GH3	1.55	Y	cellulose
Afu5g07080	beta-glucosidase	GH3	2.03	Y	cellulose
Afu5g07190	beta-glucosidase	GH3	2.24	N	cellulose
Afu6g14490	beta-glucosidase	GH3	2.58	N	cellulose
Afu7g06140	beta-D-glucoside glucohydrolase	GH3	3.03	Y	cellulose
Afu8g02100	beta-glucosidase	GH3	2.13	Y	cellulose
Afu1g17320	endo-arabinanase	GH43	4.50	Y	pectin
Afu2g00930	xylosidase	GH43	7.97	N	xylan
Afu2g13190	xylosidase: arabinofuranosidase	GH43	1.99	N	xylan
Afu2g14750	endo-arabinase	GH43	1.92	Y	pectin
Afu3g01660	glycosyl hydrolase, family 43	GH43	2.24	Y	xylan, pectin

Table 1 Main CAZymes related to biomass deconstruction upregulated in *A. fumigatus* AF293 transcriptome (Continued)

Gene ID	Gene Description	CAZy family	log ₂ FC	Peptide Signal	Predicted substrate
Afu6g00770	extracellular arabinanase	GH43	1.80	Y	xylan, pectin
Afu6g14550	xylosidase/arabinosidase	GH43	6.47	N	xylan, pectin
Afu8g04710	xylosidase	GH43	4.04	N	xylan
Afu5g01830	extracellular endoglucanase	GH5	2.00	Y	cellulose
Afu6g07480	endoglucanase	GH5	2.90	Y	cellulose
Afu7g01070	endo-1,4-beta-mannosidase	GH5	2.48	N	mannan
Afu7g05610	glucanase	GH5	5.07	N	β-1,6-glucan
Afu8g07030	endo-1,4-beta-mannosidase	GH5	1.82	Y	mannan, galactomannan, glucomannan
Afu3g01910	cellobiohydrolase	GH6	9.02	Y	cellulose
Afu2g12770	alpha-L-arabinofuranosidase	GH62	8.54	Y	arabinoxylan, arabinogalactan
Afu5g14380	Alpha-glucuronidase	GH67	2.58	Y	xylan
Afu6g07070	cellobiohydrolase celD	GH7	6.78	Y	cellulose
Afu6g11610	1,4-beta-D-glucan-cellobiohydrolyase	GH7	9.83	Y	cellulose
Afu8g01490	endoglucanase	GH74	7.89	Y	xyloglucan
Afu2g12830	UDP-glucosyl transferase family protein	GT1	1.81	N	UDP-glucosyl + acceptor
Afu8g02020	glycosyltransferase	GT2	3.09	N	–
Afu8g00650	LPS glycosyltransferase	GT25	2.11	N	UDP-glucose + lypopolysaccharide
Afu8g00640	glycosyl transferase	GT32	3.46	N	–
Afu1g06890	alpha-1,2-mannosyltransferase (Alg11)	GT4	1.01	N	GDP-mannose + Man3GlcNAc2-PP-dolichol or Man4GlcNAc2-PP-dolichol
Afu1g17030	glycosyl transferase	GT4	2.05	N	–
Afu3g07700	glucosyltransferase	GT57	1.31	N	dolichol-P-glucose + acceptor
Afu6g04450	alpha-1,2-mannosyltransferase (Mnn2)	GT71	1.46	N	GDP-mannose + heteroglycan
Afu6g14480	alpha-1,3-mannosyltransferase	GT71	1.22	N	GDP-mannose + heteroglycan
Afu2g00760	pectate lyase A	PL1	1.10	Y	pectin
Afu4g03780	rhamnogalacturonase B	PL4	1.76	Y	pectin
Afu8g00820	rhamnogalacturonase	PL4	3.09	Y	pectin

Modulated: all genes with log₂FC > 1 and < -1 in presence of SEB

Up: genes with Log₂FC > 1 in presence of SEB

Down: genes with Log₂FC < -1 in presence of SEB

Orthologous genes in *Aspergillus* and *non-Aspergillus* species were identified by sequence analysis according to *Aspergillus* Genome Database (AspGD; <http://www.aspgd.org>) [32]. Three orthologous genes encoding possible putative xylose transporters (Afu1g03530, Afu4g14610, and Afu6g14442) and five related to cellobiose transporters (Afu3g01670, Afu6g14500, Afu6g14560, Afu7g05100, and Afu8g04480) have been identified in *N. crassa*, *A. oryzae*, *A. niger*, and *A. nidulans* (Additional file 7: Table S6).

To analyze the potential xylose transporters, we selected Afu1g03530 (log₂FC = 3.43) and Afu6g14442 (log₂FC = 4.6), which are orthologous to the xtrD xylose transporter of *A. nidulans* (An0250) [54] and

show high similarity to transporters in other fungi, with conserved regions among different species [54–69]. To characterize the expression profile, *A. fumigatus* was grown in 1% xylose and 1% fructose as a carbon source for the time course (3, 6, 12, 18, 24, and 48 h). Afu6g14442 gene expression was highly induced after 3 and 6 h of cultivation in 1% xylose with an increase in up to 25-fold. On the other hand, the expression of Afu1g03530 increased to 250-, 180-, 25-, 60-, 200-, and 5-fold after 3, 6, 12, 18, 24, and 48 h, respectively (Fig. 4b). These results lead us to speculate that both genes could encode potential xylose transporters, which can be further better characterized.

Characterization of the secretome of *A. fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse

Once the transcriptome was characterized, we analyzed the secreted protein profiles of *A. fumigatus* cultivated in the same condition by SDS-PAGE and LC-MS/MS. The total protein secreted by the fungi was approximately $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ in SEB versus $112 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the fungi grown on fructose (Additional file 8: Figure S2). In the SEB supernatant, we detected 128 secreted proteins, and only 44 were detected in the fructose supernatant (Additional file 9: Table S7), 27 of which are the same for both conditions (Fig. 5a).

As previously described, in the *A. fumigatus* genome, 566 CAZyme genes (461 proteins, excluding GTs) are predicted [25]; 271 of them are predicted to be secreted (Additional file 6: Table S5). The presence of a signal peptide in these proteins was inferred using SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [44]. Approximately 78 proteins identified in SEB correspond to CAZymes in the classes GH (46), CE (8), AA (8), PL (2), and CBM (15), which is 18.61% of the total CAZymes encoded by the *A. fumigatus* genome. The remaining proteins are classified as proteins of unknown functions (17%), hydrolases/peptidases/proteases/binding proteins (14%), oxidoreductases (6%), transferases (2%),

and lyases (2%) (Fig. 5b). We have also identified intracellular proteins, suggesting cell lysis or an unknown mechanism.

The most commonly identified cellulases and hemicellulases were GH5 and GH43, respectively. When compared to previous data concerning the secretome of *A. fumigatus*, in different types of biomass [22–24], we detected CAZymes found exclusively in the SEB supernatant, such as GH10 (endo-1,4- β -xylanase), GH11 (Endo-1,4- β -xylanase (xyn11A), GH43 (β -glucosidase), GH43 (arabinase), GH47 (mannosidase), GH5 (endo-1,4- β -mannosidase) GH28 (xylogalacturonan), GH27 (α -galactosidase) GH62 (α -arabinofuranosidase) PL3 (pectate lyase) and CE1 (acetyl xylan esterase) (Table 2). Table S7 lists all these enzymes identified in both SEB and fructose conditions.

We have also identified lignin-depolymerizing enzymes such as catalase-peroxidase, cellobiose dehydrogenase, catalase B, FAD-dependent oxidase, laccase, and Cu-Zn superoxide dismutase. Although the sugarcane bagasse employed here was treated by steam explosion, traces of lignin might have remained in the substrate, which justifies the secretion of these enzymes by the fungus.

We can conclude that the most important CAZymes (GH3, GH5, GH6, GH7, GH10, GH11, GH43, GH62,

Table 2 CAZymes detected in *A. fumigatus* SEB secretome related to biomass breakdown

Uniprot Accession	Gene ID	Protein Name	CAZy Family	Score	SeqCover (%)	Peptide Signal	Substrate
Q6MYM8	Afu1g12560	endoglucanase	AA9	1158.51	13.67	Y	cellulose
Q4WP32	Afu4g07850	endoglucanase ^{a,c}	AA9	11,713.03	47.2	Y	cellulose
Q4X071	Afu2g14490	endoglucanase	AA9	1475.28	15.22	Y	cellulose
D4AHU7	Afu6g03280	swollenin	CBM1	7631.56	32.14	Y	cellulose
Q4WBW4	Afu8g06570	acetyl xylan esterase	CBM1	5408.98	9.16	Y	xylan
B0Y7U1	Afu6g09040	feruloyl esterase	CE1	250.94	11.22	Y	arabinoxylan, pectin
A4D9B6	faeC	feruloyl esterase C	CE1	3223.58	37.87	Y	xylan
Q4WIS4	Afu2g00820	extracellular GDSL-like lipase/acylhydrolase ^a	CE16	3089.24	22.45	Y	xylan, mannan
Q4WRY0	Afu1g14710	beta-glucosidase ^a	GH1	4556.9	26.5	N	cellulose
Q4WCM9	Afu6g01800	endoglucanase ^a	GH7/CBM1	6457.03	16.74	Y	cellulose
Q0H904	Afu4g09480	endo-1,4-beta-xylanase C (xlnC) ^a	GH10	34,440.44	85.23	Y	xylan
Q4WLG5	Afu6g13610	endo-1,4-beta-xylanase ^{a,c}	GH10/CBM1	7068.88	58.19	Y	xylan
V5R355	Afu3g00320	endo-1,4-beta-xylanase (XlnA) ^{a,c}	GH11	10,011.55	37.04	Y	xylan
B0Y8Q8	Afu6g12210	endo-1,4-beta-xylanase (XynG1)	GH11	1009.69	15.38	Y	xylan
Q4WQR8	Afu4g13770	glycosyl hydrolase	GH3	327.91	7.06	Y	cellulose
B0YDT3	Afu6g00770	extracellular arabinanase	GH43	4307.26	28.04	Y	xylan, pectin
Q4WIR3	Afu2g00930	xylosidase/glycosyl hydrolase ^{a,c}	GH43	2555.85	13.28	N	xylan
Q4WIU1	Afu2g00650	arabinosidase ^{a,c}	GH43	8662.27	27.8	N	pectin
Q4X046	Afu2g14750	endo-arabinase ^b	GH43	2990.38	34.88	Y	pectin
Q4WCE5	Afu8g04710	xylosidase ^a	GH43	2270.88	24.77	N	xylan
Q4WBJ5	Afu8g02510	glycosyl hydrolase family 43 protein ^c	GH43/CBM35	583.34	22.2	Y	xylan, pectin
Q4WD15	Afu6g03150	Uncharacterized protein, hydrolase activity ^a	GH5	2751.27	17.67	Y	unknown
Q4WW63	Afu5g14560	Cellulase family protein ^b	GH5	2371.35	20.15	Y	cellulose
Q4WGN1	Afu7g05610	glucanase ^a	GH5	1540.22	16.6	N	β-1,6-glucan
Q4WN62	Afu6g07480	endoglucanase	GH5	2409.74	28.1	Y	cellulose
B0Y9E7	Afu8g07030	endo-1,4-beta-mannosidase	GH5/CBM1	649.86	16.21	Y	mannan, galactomannan, glucomannan
F1DGF4	Afu6g11600	endoglucanase ^{a,c}	GH5/CBM1	8172.11	36.52	Y	cellulose
Q4WE56	Afu5g01830	extracellular endoglucanase ^a	GH5/CBMX2	6764.9	19.83	Y	cellulose
B0XWL3	Afu3g01910	cellobiohydrolase ^{a,c}	GH6/CBM1	6069.09	23.13	Y	cellulose
Q4X0P5	Afu2g12770	alpha-L-arabinofuranosidase ^a	GH62	9479.28	40.66	Y	arabinoxylan, arabinogalactan
Q4WIR4	Afu2g00920	extracellular glycosyl hydrolase/cellulase ^{a,c}	GH62/CBM1	3622.83	28.28	Y	arabinoxylan
B0Y793	Afu6g07070	cellobiohydrolase celD ^{a,c}	GH7	21,820.01	54.65	Y	cellulose
Q4WM08	Afu6g11610	1,4-beta-D-glucan-cellobiohydrolase ^{a,b}	GH7/CBM1	24,706.69	35.53	Y	cellulose
T1YVP0	N/A	Glucanase ^a	GH7/CBM1	6572.88	24.78	Y	cellulose
Q4WLW1	Afu6g12120	BNR/Asp-box repeat domain protein	GH93	778.23	16.32	Y	pectin

^aProteins identified in this study, which have also been identified in a previous study [23]^bProteins identified in this study, which have also been identified in a previous study [22]^cProteins identified in this study, which have also been identified in a previous study [24]

GH93, CE1, CE16 and AA9 (LPMO)) were secreted and play important roles in biomass degradation. For the first time, new proteins such as GH16 (endo-1,4-beta-glucanase), GH5 (endoglucanase), LPMO (AA9), swollenin and GH3 (β -glucosidase) were identified in the *Aspergillus fumigatus* secretome, probably because we used sugarcane bagasse as the source of carbon, and these enzymes can be specific to this complex biomass.

Integration of secretomics and transcriptomics

We observed weak correlations between transcriptome and secretome datasets, mainly because we chose the same time (24 h) to isolate mRNA and proteins. Considering that *Aspergillus* needs at least a few hours to translate mRNA to protein and to secrete it, these data provide an idea about which proteins are transcribed earlier or produced constitutively. Among the 1181 upregulated genes in transcriptome, 63 encoded proteins were detected in the secretome. As the same way, 16 of secreted proteins were identified as downregulated in RNAseq data (Fig. 6). In addition, the weak correlation observed could be the result of the influence of some factors that alter transcription and translation mechanisms [22, 23, 54].

The both data revealed a significant upregulation of secreted CAZymes, which is important for the observation of specific alterations triggered by different conditions. Among the 135 upregulated CAZyme genes, 48 encoded proteins were detected in the secretome, mainly cellulolytic and hemicellulolytic enzymes (Table 3). Four enzymes, β -1,3-endoglucanase EglC (Afu3g00270), FAD-dependent oxygenase (Afu3g00840), FAD/FMN-containing isoamyl alcohol oxidase MreA (Afu6g03620) and

oligopeptidase family protein (Afu8g04730), were downregulated when the strain was cultivated in SEB but were detected in the secretome.

The variation in expression during fungal growth in the presence of SEB was observed for some genes in the qRT-PCR data (Fig. 3). We observed that the gene expression depends on the duration of incubation, which explains the low correlation between the data of the secretome and transcriptome and supports the hypothesis that the approach used in this study is able to provide information about the modulation of gene expression of *A. fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. Genes encoding enzymes that are upregulated in the transcriptome (the highest $\log_2$ FC) and are present in the proteome, as well, are described in Table 3. The main enzymes produced by the fungus are endo- β 1,4-xylanase, cellobiohydrolase B, endoglucanase and arabinofuranosidase, which leads us to speculate that *A. fumigatus* spent its energy on the transcription and production of cellulolytic and xylanolytic compounds, which were probably being secreted for biomass degradation and the release of small sugars.

Discussion

In Brazil, sugarcane bagasse is an important agro-industrial residue. It is composed of cellulose (25–45%), hemicellulose (28–32%), lignin (15–25%) and a small percentage of other compounds [70, 71]. Despite this recalcitrant composition, efficient hydrolysis mechanisms allow the release of fermentable sugars from sugarcane bagasse and their later use to produce cellulosic ethanol [18, 72–74]. Transcriptomic and/or proteomic studies on filamentous fungi have been employed to understand and to improve enzymatic cocktails to deconstruct plant biomass. Such studies have revealed a huge repertoire of cellulases and hemicellulases [4, 18, 19, 75–77]. *N. crassa*, *A. niger*, *T. reesei* and *A. nidulans* are excellent enzyme producers for industrial applications, and several studies have focused on these fungi [78–82]. Understanding the molecular mechanisms through which fungi degrade plant biomass can improve the SEB saccharification step, which is important for Brazilian 2G ethanol production [4, 18, 19, 83, 84].

To gain more insight into new enzymes and to identify new genes specific to sugarcane biomass hydrolysis, we have chosen to investigate *A. fumigatus* because it is widely distributed in the environment, it can degrade plant biomass, and it is an excellent enzyme producer [21]. To the best of our knowledge, this is the first study on transcriptional response and secretome of *A. fumigatus* grown on sugarcane steam-exploded bagasse.

There are few omic studies on biomass hydrolysis by *A. fumigatus* [22–25], and only one study has analyzed the transcriptome of *A. fumigatus* when grown

Table 3 CAZymes identified in both transcriptome and secretome of *A. fumigatus* grown on SEB

Gene ID	Gene Description	CAZy family	log ₂ FC
Afu3g00320	endo-1,4-beta-xylanase (XlnA)	GH11	10.39
Afu6g11610	1,4-beta-D-glucan-cellobiohydrolase	GH7	9.83
Afu6g01800	endoglucanase	CBM1	9.58
Afu2g00920	extracellular glycosyl hydrolase/cellulase	CBM1	9.35
Afu6g13610	endo-1,4-beta-xylanase	CBM1	9.21
Afu6g12120	BNR/Asp-box repeat domain protein	GH93	9.07
Afu3g01910	Putative cellobiohydrolase	GH6	9.02
Afu4g09480	extracellular endo-1,4-beta-xylanase	GH10	8.82
Afu4g07850	endoglucanase	AA9	8.75
Afu2g12770	alpha-L-arabinofuranosidase	GH62	8.54
Afu6g11600	endoglucanase	CBM1	8.11
Afu2g00930	xylosidase/glycosyl hydrolase	GH43	7.97
Afu3g03080	Endo-1,3(4)-beta-glucanase, putative	GH16	7.70
Afu8g06570	acetyl xylan esterase	CBM1	7.57
Afu6g03280	swollenin	CBM1	7.51
Afu8g06890	Probable endo-xylogalacturonan hydrolase A (xghA)	GH28	6.99
Afu6g12210	endo-1,4-beta-xylanase (XynG1)	GH11	6.91
Afu6g07070	cellobiohydrolase celD	GH7	6.78
Afu5g01190	Uncharacterized protein, alpha-L-fucosidase activity	GH65	6.49
Afu2g17620	Cellobiose dehydrogenase	AA8	6.45
Afu2g15420	Uncharacterized protein	GH131	6.41
Afu6g14540	Endo-1,3(4)-beta-glucanase, putative	GH16	6.37
Afu8g01410	Endochitinase B1 (chiB1)	GH18	5.79
Afu2g03980	Alpha-1,3-glucanase/mutanase, putative	GH71	5.38
Afu3g14510	Rhamnogalacturonan acetyltransferase (RgaE)	CE12	5.19
Afu7g05610	glucanase	GH5	5.07
Afu7g05140	Class III chitinase, putative	GH18/CBM19	4.86
Afu3g07160	Class V chitinase, putative	GH18	4.25
Afu3g00420	acetyl xylan esterase (Axe1)	CBM1	4.13
Afu8g04710	xylosidase	GH43	4.04

Table 3 CAZymes identified in both transcriptome and secretome of *A. fumigatus* grown on SEB (Continued)

Gene ID	Gene Description	CAZy family	log ₂ FC
Afu6g12070	FAD binding domain protein	AA7	3.48
Afu1g14710	beta-glucosidase	GH1	3.42
Afu6g10130	N, O-diacetyl muramidase, putative	GH25	3.23
Afu1g14450	Exo-1,3-beta-D-glucanase, putative (exgO)	GH55	3.19
Afu2g00690	glucan 1,4-alpha-glucosidase	CBM20	2.94
Afu5g10930	Uncharacterized protein	PL20	2.91
Afu6g07480	endoglucanase	GH5	2.9
Afu5g10520	Alpha-1,2-mannosidase family protein	GH92	2.86
Afu8g07120	Endo-1,6-beta-D-glucanase neg1	GH30	2.76
Afu2g14520	Hydrolase, putative	GH2	2.67
Afu1g05290	Endo-1,3(4)-beta-glucanase, putative	GH16	2.38
Afu2g14530	esterase D	CE1	2.16
Afu5g01830	extracellular endoglucanase	GH5	2
Afu2g14750	endo-arabinase	GH43	1.92
Afu8g07030	endo-1,4-beta-mannosidase	GH5	1.82
Afu8g02510	glycosyl hydrolase family 43 protein	CBM35	1.61
Afu4g13770	glycosyl hydrolase	GH3	1.55
Afu6g02560	Alpha-galactosidase	GH27	1.36

on polysaccharide substrates. Miao et al. [25] conducted a transcriptional study on the induction of CAZymes by this fungus grown on cellulose, oat spelt xylan, rice straw and sucrose. The authors showed that important genes are differentially expressed in each carbon source.

Here, we found few discrepancies in the number of induced genes when we used SEB as carbon source (Table 4). The main CAZyme families (GH1, GH3, GH5, GH6, GH7, GH10, GH11, GH12, GH43, GH62, GH67, GH74, AA9, CE3, CE5 and CE16 [85]) were also induced. However, important genes including GH45, GH51, GH54, GH93, GH115, and CE1 were downregulated in SEB. Furthermore, two important genes were exclusively induced in SEB: PL4 (Afu4g03780 and Afu8g00820), which plays a role in pectin breakdown, and CBM35 (Afu8g02510), which is known to bind primarily to xylan and mannans [86]. The distinct gene expression was most likely due to substrate composition and to cultivation time, which was 24 h for our analysis. Shorter cultivation times could point out new pattern to gene induction. In qRT-PCR data, we observed that 6 h

Table 4 *Aspergillus fumigatus* transcriptome studies using different carbon sources

Strain	Technology	Carbon source	Time	Total number of CAZymes genes upregulated	Reference
<i>A. fumigatus</i> Z5	Illumina	cellulose, xylan, rice straw, oat spelt	16 h	47, xylan; 143, rice straw; 157, cellulose	[25]
<i>A. fumigatus</i> AF293	Illumina	sugarcane exploded bagasse	24 h	135, SEB	This work

is the beginning of gene expression, which might represent a standard mechanism in which *A. fumigatus* acts in contact with complex biomass sources and should contain more highly induced enzymes. These results also explain the percentage (35%) of differentially expressed CAZymes identified in the RNA-Seq data at 24 h.

Because glycosyltransferases (GTs) contribute to fungal cell remodeling, the percentage of upregulated genes was low (~1%). Likewise, Miao et al. [25] described that genes encoding GTs are downregulated in Z5 strain, which supports the idea that GTs do not directly participate in the hydrolysis of complex biomass.

In this sense, the biomass itself has to be investigated in order to understand sugarcane biomass hydrolysis as well as possible. A similar work performed by Borin et al., 2017 [18] described a transcriptional response of *A. niger* and *T. reesei* grown in SEB for different periods. They found 190 upregulated CAZymes from 62 different families in *A. niger*, and 105 genes of 51 CAZyme families in *T. reesei*, whereas we detected 135 upregulated CAZymes in the *A. fumigatus* transcriptome herein. The number of genes induced by each microorganism was different and depended on time. A higher number of DEGs in *A. niger* and *T. reesei* was observed in 24 h of culture, and so we then compared our data at this duration, and again small differences in upregulated CAZymes were observed.

After biomass hydrolysis, which breaks down cellulose and hemicellulose into mono- or disaccharides, the released sugars need to be transported into the cells through a large number of sugar transporters, most of which have not been characterized yet [20, 21, 87]. One of the main challenges concerning biofuel production from lignocellulosic biomass is the inability of organisms to grow on, to transport, and to ferment sugars other than glucose (e.g., xylose and cellobiose). Gaining a better insight into potential xylose and/or cellobiose transporters seems to be a good approach to overcome this challenge [87]. These transporters represent an important industrial tool that can be applied to different industrial processes [88–90]. Additionally, the genomes of filamentous fungi also encode large numbers of major facilitator superfamily (MFS) transporters. For example, the *T. reesei* and *A. nidulans* genomes have been predicted to encode 164 and 357 proteins belonging to MFS, respectively, although the exact number of proteins involved in sugar transport remains unknown [91–93].

We were also interested in new sugar transporters, such as the xylose transporter. Until now, no sugar

transporter for *A. fumigatus* related to biomass breakdown has been described. We verified that the 25 DEG homolog transporters had particular expression profiles, upregulated or downregulated, suggesting that SEB hydrolysis released enough glucose, xylose or cellobiose to regulate sugar transporter gene expression. Another interesting finding was that two sugar transporters (Afu6g14442 and Afu1g03530) were highly induced in SEB (25.5 times and 10 times, respectively) and in the presence of 1% xylose, which revealed that these sugar transporters could be specific xylose transporters in *Aspergillus fumigatus*. Overexpression of xylose transporters in *S. cerevisiae* is a fast way to use xylose and may improve ethanol productivity [94].

In addition to the transcriptome, we evaluated the proteins secreted by *A. fumigatus* by SDS-PAGE and LC-MS/MS. Similarly, three studies compared the secretome of *A. fumigatus* on complex substrates (Table 2) [22–24]. Liu et al., [24] identified 152 proteins on rice straw and 125 different proteins on Avicel. Adav et al., [23] quantified 73 proteins belonging to cellulases, glycoside hydrolases and amylases. We detected some secreted proteins that were also identified when *A. fumigatus* was grown on corn, wheat, soybean, Avicel, rice straw, xylan, and starch as carbon source. However, for the first time, we verified important secreted CAZymes like swollenin (CBM1), two putative endoglucanases (LPMO) (AA9), acetyl xylan esterase (CBM1), two feruloyl esterases (CE1), endo-1,4-beta-xylanase (GH11), endo-1,3(4)-beta-glucanase (GH16), glycosyl hydrolase (GH3), endoglucanase (GH5), arabinanase (GH43), endo-1,4-beta-mannosidase (GH5/CBM1), and arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (GH53). In this way, we can conclude that we detected similar amounts of proteins with those previously described, which may be specific for SEB biomass.

These data showed that, although the transcriptome data did not reveal potential new enzyme targets for the deconstruction of sugarcane biomass deconstruction, the secretome analyses indicated key enzymes that may be essential for this hydrolysis and which act synergistically for efficient deconstruction. We clearly observed the need for accessory enzymes secreted as LPMO and swollenin, which have never been described in other *A. fumigatus* secretome analyses [95], which allowed us to conclude that the other secreted CAZymes together with AA9 identified in *A. fumigatus* form a potential arsenal of hydrolytic enzymes.

LPMOs have recently been implicated in lignocellulosic biomass degradation. Although these enzymes were first classified into the GH61 and CBM33 families, they are currently classified into the AA9 and AA10 families. These enzymes cleave the lignocellulosic biomass glycosidic bonds through an oxidative mechanism that provides new ends for the recognition of cellulases and for action on cellulose [95, 96]. In addition, AA9s have been identified in *A. niger*, *M. thermophile*, *T. asperellum*, and *T. reesei* secretome growth in sugarcane bagasse, which allows us to conclude that they play an important role in lignocellulosic biomass breakdown [4, 95–99].

Many studies have focused on LPMO enzymes, and some works have even characterized them, but no investigations into LPMO enzymes from *A. fumigatus* are available so far [96]. Hence, the role of most of these enzymes remains unclear, and AA expression during *A. fumigatus* growth on bagasse suggests that they play an important part in biomass degradation.

Together, the transcriptome and secretome have shown several enzymes that *A. fumigatus* uses to hydrolyze SEB and which most likely act synergistically to depolymerize cellulose and hemicellulose. In most *Aspergillus* species, distinct genes encode the same class of enzymes (isoenzymes) [77], as observed by the data regarding the *A. fumigatus* secretome and transcriptome. Our results suggest that complete hydrolysis of this lignocellulose biomass to simple sugars, such as glucose, xylose, and arabinose, requires the combined actions of several enzymes that have different substrate specificities and act synergistically. The great potential of this species is evident, and its enzymes can contribute to optimization of enzymatic cocktails for use in 2G bioethanol production.

Conclusion

Through these findings, it is suggested that different biomasses require a set of enzymes due its complexity and *A. fumigatus* Af293 is an excellent CAZymes producer for sugarcane biomass breakdown. The analysis of proteome and transcriptome revealed a set of CAZymes highly expressed and secreted, such as cellulases, hemicellulases, delignification and auxiliary enzymes necessary to SEB breakdown. In addition, from CAZymes proteins, LPMOs, which could contribute to better degradation of cellulose, were also detected in *A. fumigatus* secretome. Cellobiohydrolases, endoglucanases and LPMOs can act synergistically in cellulose depolymerization and LPMOs can be included in the most advanced enzymatic cocktails. Altogether, the data show that despite the pathogenicity of *A. fumigatus*, it can produce a wide variety of enzymes, which can be expressed in a nonpathogenic microorganism and may contribute to the optimization of currently marketed enzymatic cocktails for the viable production of 2G bioethanol.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. R script of RNA sequencing analysis. (PDF 2406 kb)

Additional file 2: Table S1. Raw Count matrix of genes found in RNA-seq. (XLSX 585 kb)

Additional file 3: Table S2. Sequence of primers from genes upregulated in RNA-seq data selected for qRT-PCR. (XLSX 11 kb)

Additional file 4: Table S3. Up and downregulated genes in SEB. (XLSX 314 kb)

Additional file 5: Table S4. Functional enrichment analysis with FunCat of up- and downregulated genes in *Aspergillus fumigatus* grown in SEB. (XLSX 12 kb)

Additional file 6: Table S5. CAZymes families in *A. fumigatus* genome and predicted peptide signal. (XLSX 32 kb)

Additional file 7: Table S6. *A. fumigatus* sugar transporters modulated in RNA-seq data. (XLSX 13 kb)

Additional file 8: Figure S2. Proteins from *A. fumigatus* secretome separated by SDS-PAGE. (PPTX 283 kb)

Additional file 9: Table S7. Proteins detected in the secretome of *Aspergillus fumigatus* grown in SEB by coupled system type LC-MS/MS. (XLSX 37 kb)

Abbreviations

ASPGD: *Aspergillus* genome database; bp: Base pair; CAZymes: Carbohydrate-active enzymes; cDNA: Complementary DNA; CMC: Carboxymethylcellulose; CPM: Counts per million; DEGs: Differentially expressed genes; DNA: Deoxyribonucleic acid; DNS: Dinitrosalicylic acid; DTT: Dithiothreitol; FDR: False rate discovery; FPKM: Fragments per kilobase of exon per million mapped reads; HCl: Hydrochloric acid; kb: Kilobases; log₂FC: Log of fold-change in base 2; LPMO: Lytic polysaccharides mono-oxygenase; M: Molar (mol L⁻¹); m/z: Mass/charge relation; min: Minute; mM: Millimolar; mRNA: Messenger RNA; NGS: New generation sequencing; PCR: Polymerase chain reaction; pH: Hydrogenionic potential; qRT-PCR: Real-time quantitative PCR; RNA: Ribonucleic acid; RNAseq: RNA sequencing; rpm: Rotations per minute; SDS: Sodium dodecyl sulphate; SDS-PAGE: SDS-polyacrilamide gel electrophoresis; SEB: Steam-exploded bagasse; Tris: Tris- (hydroxymethyl) aminoethane; U: Units; V: Volts; v/v: Volume/volume ratio; w/v: Weight/volume ratio; µg: Micrograms; µM: Micromolar

Acknowledgments

The authors would like to thank Laboratório de Alto Desempenho em Sequenciamento e Robótica do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Campinas, SP, Brazil and its technician Dr. Douglas Paixão for technical support with the Illumina HiSeq 2500.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2014/10466-0). AVB and LEG were funded by scholarships granted by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). PFG was funded by a scholarship granted by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analysed during this study are included in this published article and its Additional files 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9. The raw data from *A. fumigatus* RNAseq are available at the NCBI's Gene Expression Omnibus under the accession code GSE95798 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE95798>), the underlying strand-specific raw short reads were deposited at the NCBI's Short Read Archive and are associated to the BioProject PRJNA376829 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA376829>).

Authors' contributions

PFG and AVB contributed substantially to the experimental work, data analyses and were involved in writing the manuscript and preparation of figures/tables, and offered intellectual contributions. LEG carried out secretome experiments and intellectual contributions. ESS carried out RNAseq experiments, data

analyses and offered intellectual contributions. DMRP performed the analysis of RNAseq data, offered intellectual contributions and wrote the manuscript. SAU offered intellectual contributions at various stages of this work and provided critical reviews of the manuscript. TMD participated in the design and coordination of the study, wrote the manuscript, and conducted the final analysis of the data. All the authors have read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate
Not applicable.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of Ribeirão Preto, Chemistry Department, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ²Faculty of Pharmaceutical Science, Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ³Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil. ⁴Current address: Laboratory of Regulatory Systems Biology, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Received: 15 January 2018 Accepted: 27 March 2018
Published online: 03 April 2018

References

- Souza GM, Victoria RL, Joly CA, Verdade LM. Bioenergy & Sustainability: bridging the gaps. 2015. <http://bioenfapesp.org/scopebioenergy/index.php>.
- Cheng JJ, Timilsina GR. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. *Renew En*. 2011;36:3541–9.
- Moyes DN, Reis VC, de Almeida JR, de Moraes LM, Torres FA. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. *J Mol Sci*. 2016;17:207.
- Borin GP, Sanchez CC, de Souza AP, de Santana ES, de Souza AT, Leme AFP, et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129275.
- Novacana. <http://www.novacana.com> (2016) Accessed 20 Nov 2016.
- Conab. <http://www.conab.gov.br> (2017) Accessed 10 Nov 2017.
- Milanez AY, Nyko D, Valente MS, de Sousa LC, Bonomi A, de Jesus CDF, et al. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar: uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. *BNDDES Setorial*, Rio de Janeiro. 2015;41:237–94. <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/4283>
- Batalha LAR, Han Q, Jameel H, Chang H, Colodette JL, Gomes FJB. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. *Bioresour Technol*. 2015;180:97–105.
- Pereira SC, Maehara L, Machado CM, Farinas CS. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:44–60.
- Sindhu R, Binod P, Pandey A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - an overview. *Bioresour Technol*. 2016;199:76–82.
- Sambusiti C, Licari A, Solhy A, Aboulkas A, Cacciaguerra T, Barakat A. One-pot dry chemo-mechanical deconstruction for bioethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*. 2015;181:200–6.
- Glass NL, Schmoll M, Cate JHD, Coradetti S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:477–98.
- Wang Y, Fan C, Hu H, Li Y, Sun D, Wang Y, Peng L. Genetic modification of plant cell walls to enhance biomass yield and biofuel production in bioenergy crops. *Biotechnol Adv*. 2016;34:997–1017.
- Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*. 2002;83:1–11.
- Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew Sustain En Rev*. 2014;36:91–106.
- Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, Bugg TD, Distel DL, Dupree P, et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life. *Curr Opin Chem Biol*. 2015;29:108–19.
- Sharma RK, Arora DS. Fungal degradation of lignocellulosic residues: an aspect of improved nutritive quality. *Crit Rev Microbiol*. 2015;41(1):52–60.
- Borin GP, Sanchez CC, Santana ES, Zanini GK, dos Santos RAC, Pontes AO, et al. Comparative transcriptome analysis reveals different strategies for degradation of steam-exploded sugarcane bagasse by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics*. 2017;18(1):501.
- Damasio AR, Rubio MV, Gonçalves TA, Persinoti GF, Segato F, Prade RA, et al. Xyloglucan breakdown by endo-xyloglucanase family 74 from *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:2893–903.
- Culleton H, McKie V, de Vries RP. Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: what have we learned from *Aspergillus*? *Biotechnol J*. 2013;8:884–94.
- van den Brink J, de Vries RP. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91(6):1477–92.
- Sharma GP, Ouyang H, Wang Q, Luo Y, Shi B, Yang J, et al. Insight into enzymatic degradation of corn, wheat, and soybean cell wall cellulose using quantitative secretome analysis of *Aspergillus fumigatus*. *J Proteome Res*. 2016;15(12):4387–402.
- Adav SS, Ravindran A, Sze SK. Quantitative proteomic study of *aspergillus fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes. *J Proteome*. 2015;119:154–68.
- Liu D, Li J, Zhao S, Zhang R, Wang M, Miao Y, et al. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnol Biofuels*. 2013;6(1):149.
- Miao Y, Liu D, Li G, Li P, Xu Y, Shen Q, Zhang R. Genome-wide transcriptomic analysis of a superior biomass-degrading strain of *A. fumigatus* revealed active lignocellulose-degrading genes. *BMC Genomics*. 2015;16:459.
- Amore A, Giacobbe S, Faraco V. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Curr Gen*. 2013;14:230–49.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 1959;31:426–8.
- Andrew S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2010).
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
- Kopylova E, Noé L, Touzet H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*. 2012;28(24):3211–7.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*. 2013;14(4):R36.
- Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, et al. The *aspergillus* genome database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(1):D705–10.
- Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 2005;438(1):151–6.
- Wang L, Wang S, Li W. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics*. 2012;28(16):2184–5.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. The subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(10):e108.
- R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org/> (2015).
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139–40.
- Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11:R25.
- Glueck DH, Mandel J, Karimpour-Fard A, Hunter L, Keith E. Exact calculations of average power for the Benjamini-Hochberg procedure. *Int J Biostat*. 2008;4(1):11.
- Hammond JBW, Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Walker JM, editor. *New protein techniques. Methods in molecular biology*, vol 3: Humana Press; 1988.

41. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:14440–5.
42. Pundir S, Martin MJ, O'Donovan C, UniProt Consortium. UniProt tools. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;53:1.29–1.15. www.uniprot.org. Accessed 10 Dec 2015.
43. Briesemeister S, Rahnenführer J, Kohlbacher O. Going from where to why—interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics*. 2010;26(9):1232–8.
44. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat methods*. 2011;8(10):785–6.
45. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel*. 2004;17(4):349–56.
46. Finn RD, Clements J, Arndt W, Miller BL, Wheeler TJ, Schreiber F, et al. HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W30–8.
47. Yin Y, Mao X, Yang JC, Chen X, Mao F, Xu Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(W44):5–1.
48. Semighini CP, Marins M, Goldman MHS, Goldman GH. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(3):1351–7.
49. Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, et al. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:5539–45.
50. Inglis DO, Binkley J, Skrzypek MS, Arnaud MB, Cerqueira GC, Shah P, Wymore F, Wortman JR, Sherlock G. Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol*. 2013;13:91.
51. BioInfoX. <http://bioinfox.com/free/bxarrays/venndiagram.php> Accessed 10 July 2016.
52. Carbohydrate Active Enzymes Database. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D490–D495. <http://www.cazy.org> Accessed 26 Mar 2016.
53. Percival YHZ, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*. 2006;24:452–81.
54. Colabardini AC, Ries LN, Brown NA, Dos Reis TF, Savoldi M, Goldman MH, et al. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7(1):46.
55. de Souza WR, de Gouvea PF, Savoldi M, Malavazi I, Bernardes LAS, Goldman MH, et al. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. *Biotechnol Biofuels*. 2011;4:40.
56. Meyer V, Arentshorst M, Flitter SJ, Nitsche BM, Kwon MJ, Reynaga-Peña CG, et al. Reconstruction of signaling networks regulating fungal morphogenesis by transcriptomics. *Eukaryot Cell*. 2009;8(11):1677–91.
57. Lewis DA, Bisson LF. The HXT1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. *Mol Cell Biol*. 1991; 11(7):3804–13.
58. Fan J, Chaturvedi V, Shen SH. Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Mol Evol*. 2002;55(3):336–46.
59. Pengli C, Ruimeng G, Bang W, Jingen L, Li W, Chaoguang T, Yanhe M. Evidence of a critical role for cellodextrin transporter 2 (CDT-2) in both cellulose and hemicellulose degradation and utilization in *Neurospora crassa*. *PLoS One*. 2014;9(2):e89330.
60. Tamano K, Sano M, Yamane N, Terabayashi Y, Toda T, Sunagawa M, et al. Transcriptional regulation of genes on the non-synthetic blocks of *Aspergillus oryzae* and its functional relationship to solid-state cultivation. *Fungal Genet Biol*. 2008;45(2):139–51.
61. Wei H, Vienken K, Weber R, Bunting S, Requena N, Fischer R. A putative high affinity hexose transporter, hxtA, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genet Biol*. 2004;41(2):148–56.
62. Kwon MJ, Jørgensen TR, Nitsche BM, Arentshorst M, Park J, Ram AF, Meyer V. The transcriptomic fingerprint of glucoamylase over-expression in *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*. 2012;13:701.
63. Jørgensen TR, Goosen T, Hondel CA, Ram AF, Iversen JJ. Transcriptomic comparison of *Aspergillus niger* growing on two different sugars reveals coordinated regulation of the secretory pathway. *BMC Genomics*. 2009;10:44.
64. Guillemette T, van Peij N, Goosen T, Lanthaler K, Robson GD, van den Hondel CA, et al. Genomic analysis of the secretion stress response in the enzyme-producing cell factory *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*. 2007;8:158.
65. Noguchi Y, Sano M, Kanamaru K, Ko T, Takeuchi M, Kato M, Kobayashi T. Genes regulated by AoXlnR, the xylanolytic and cellulolytic transcriptional regulator, in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;85(1):141–54.
66. Andersen MR, Nielsen J. Current status of systems biology in aspergilli. *Fungal Genet Biol*. 2009; <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.006>.
67. Sá-Pessoa J, Amillis S, Casal M, Dailianas G. Expression and specificity profile of the major acetate transporter AcpA in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 2015;76:93–103.
68. Salazar M, Vongsangnak W, Panagiotou G, Andersen MR, Nielsen J. Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data analysis. *Mol Gen Genomics*. 2009;282(6):571–86.
69. Fekete E, Karaffa L, Seiboth B, Fekete E, Kubicek CP, Flippin M. Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 2012;49(6):415–25.
70. Lima MS, Damasio AR, Crnkovic PM, Pinto MR, da Silva AM, da Silva JC, et al. Co-cultivation of *Aspergillus nidulans* recombinant strains produces an enzymatic cocktail as alternative to alkaline sugarcane bagasse pretreatment. *Front Microbiol*. 2016;7:583.
71. Buckeridge MS. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiol*. 2010;154: 1017–23.
72. Farzad S, Mandegari MA, Guo M, Haigh KF, Shah N, Görgens JF. Multi-product biorefineries from lignocelluloses: a pathway to revitalisation of the sugar industry? *Biotechnol Biofuels*. 2017;10:87.
73. Calderan-Rodrigues MJ, Jamet E, Douché T, Bonassi MB, Cataldi TR, Fonseca JG, et al. Cell wall proteome of sugarcane stems: comparison of a destructive and a non-destructive extraction method showed differences in glycoside hydrolases and peroxidases. *BMC Plant Biol*. 2016;16:14.
74. Buckeridge MS, de Souza AP. Breaking the “Glycomic code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass. *Bioenergy Res*. 2014;7(4):1065–73.
75. Ribeiro DA, Cota J, Alvarez TM, Bruchli F, Bragato J, Pereira BM, et al. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. *PLoS One*. 2012; 7:e50571.
76. Saykhedkar S, Ray A, Ayoubi-Canaan P, Hartson SD, Prade RA, Mort AJ. A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum Stover. *Biotechnol Biofuels*. 2012;5(1):52.
77. Benoit I, Culleton H, Zhou M, DiFalco M, Aguilar-Osorio G, Battaglia E, et al. Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. *Biotechnol Biofuels*. 2015;8:107.
78. Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 2003;422:859–68.
79. Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 2005;438:1157–61.
80. Pel HJ, De Winder JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol*. 2007;25:221–31.
81. Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol*. 2008;26(5):553–60.
82. Pontercorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AWJ. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet*. 1953;5:141–238.
83. Vicentini R, Bottcher A, Brito MS, Dos Santos AB, Creste S, Landell G, et al. Large-scale transcriptome analysis of two sugarcane genotypes contrasting for lignin content. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134909. Erratum in: *PLoS One*. 2015;10(9):e0137698.
84. Horta MA, Vicentini R, Delabona PS, Laborda P, Crucello A, Freitas S, et al. Transcriptome profile of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 induced by sugarcane bagasse. *PLoS One*. 2014;9(2):e88689.
85. Segato F, Damasio AR, de Lucas RC, Squina FM, Prade RA. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014; 78:588–613.
86. Montanier C, van Bueren AL, Dumon C, Flint JE, Correia MA, Prates JA, et al. Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9): 3065–70.

87. Dos Reis TF, de Lima PB, Parachin NS, Mingossi FB, Oliveira JVC, Ries LN, Goldman GH. Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9:204.
88. Turner TL, Kim H, Kong II, Liu JJ, Zhang GC, Jin YS. Engineering and evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to produce biofuels and chemicals. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2016; https://doi.org/10.1007/10_2016_22.
89. Zhang J, Zhang B, Wang D, Gao X, Hong J. Improving xylitol production at elevated temperature with engineered *Kluyveromyces marxianus* through over-expressing transporters. *Bioresour Technol*. 2015;175:642–5.
90. Zhang W, Yi ZL, Huang JF, Li FC, Hao B, Li M, et al. Three lignocellulose features that distinctively affect biomass enzymatic digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in *Miscanthus*. *Bioresour Technol*. 2013;130:30–7.
91. Payne CM, Knott BC, Mayes HB, Hansson H, Himmel ME, Sandgren M, et al. Fungal cellulases. *Chem Rev*. 2015;115:1308–448.
92. Jordan DB, Bowman MJ, Braker JD, Dien BS, Hector RE, Lee CC, et al. Plant cell walls to ethanol. *Biochem J*. 2012;442:241–52.
93. Ferreira ME, Colombo AL, Paulsen I, Ren Q, Wortman J, Huang J, et al. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*. 2005;43(Suppl. 1):S313–9.
94. Hou J, Qiu C, Shen Y, Li H, Bao X. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose. *FEMS Yeast Res*. 2017;17:fox034.
95. Berrin JG, Rosso MN, Abou HM. Fungal secretomics to probe the biological functions of lytic polysaccharide monooxygenases. *Carbohydr Res*. 2017;448:155–60.
96. Mondlaro AV, Filho EXF. Fungal lytic polysaccharide monooxygenases from family AA9: recent developments and application in lignocellulose breakdown. *Int J Biol Macromol*. 2017;102:771–8.
97. Dos Santos HB, Bezerra TMS, Pradella JGC, Delabona P, Lima D, Gomes E, et al. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. *AMB Express*. 2016;6(1):103.
98. Marx IJ, van Wyk N, Smit S, Jacobson D, Viljoen-Bloom M, Volschenk H. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotech Biofuels*. 2013;6(1):172.
99. Herpoël-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Mollé D, Lignon S, et al. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotech Biofuels*. 2008;1:18.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit