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

**Identificação das principais enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus*
quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar**

Aline Vianna Bernardi

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO-SP
2017

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

**Identificação das principais enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus*
quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar**

Aline Vianna Bernardi

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientadora: Profª. Dra. Taisa Magnani Dinamarco

RIBEIRÃO PRETO-SP
2017

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

Identificação das principais enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar. Ribeirão Preto, 2017.

94p. : il. ; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientadora: Dinamarco, Taisa Magnani

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Enzimas hidrolíticas. 4. Etanol de segunda geração. 5. RNA-seq

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BERNARDI, Aline Vianna

Título: Identificação das principais enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação 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 Mestre em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta dissertação...

*À minha família, por todo amor e incentivo durante todos os momentos de
minha vida;*

*Em memória de minha amada prima Luana, que partiu cedo demais e deixou
uma saudade infinita em nossos corações.*

“Amo muito todos vocês!”

Agradecimentos

À minha orientadora, **Profa. Dra. Taisa Magnani Dinamarco**, pela confiança depositada, pelo exemplo de boa orientação e pelos inúmeros ensinamentos transmitidos durante esta jornada.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura**, por disponibilizar gentilmente seu laboratório e tornar possível a realização deste trabalho.

Aos amigos do meu grupo de pesquisa, **Dra. Paula F. de Gouvêa Bizzi e Luis Eduardo Gerolamo**, pela imensa ajuda em todas as etapas desse trabalho e pelos inúmeros momentos de amizade e descontração.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP, **Me. Emerson S. Santos e Me. Laís L. L. Bálico**, pela grande ajuda nos experimentos, por contribuírem muito para o meu aprendizado e pela grande amizade construída.

Aos meus pais, **Renata e José Roberto**, que sempre fizeram tudo por mim. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Aos meus irmãos, **Ana Flávia e Pedro**, por todo amor e cumplicidade, e por me proporcionarem os momentos mais alegres de minha vida.

Ao demais familiares, avós, tios e primos, pelo amor e pelo apoio em todos os momentos de minha vida. Em especial, à minha avó **Benilda** e ao meu avô **José Luiz**, que não estão mais presentes fisicamente, mas que estarão sempre em meu coração.

À minha cachorrinha **Lindinha**, pelo amor incondicional e por estar ao meu lado (literalmente) em todos os momentos.

Ao meu namorado **Fabio**, pelo amor e companheirismo em todos os momentos. Agradeço também por todo o incentivo e por sempre acreditar em mim.

Aos amigos da FCFRP, **Bianca Gasparotto, Juliana Y. Sakita, Lais B. Fugio, Dr. Lucas O. Sousa e João J. Franco**, pelas boas risadas e por todos os momentos de amizade.

Aos amigos pós-graduandos do Departamento de Química-FFCLRP e aos amigos que passaram por lá, por todos os bons momentos e por sempre torcerem por mim.

À **Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino** e ao seu grupo de pesquisa, pela disponibilidade de muitos equipamentos necessários para a realização desse trabalho.

Ao **Dr. Diego M. Riaño Pachón**, pela colaboração nas análises de bioinformática.

Ao **Dr. Fábio Márcio Squina** e ao **Me. Douglas A. A. Paixão**, por todo auxílio na realização das análises de RNA-seq.

Ao **Laboratório de Alto Desempenho em Sequenciamento e Robótica do CTBE**, pelo espaço e equipamentos utilizados na realização das análises de RNA-seq.

Ao **Laboratório Multiusuário Centralizado de Genômica Funcional e Aplicada à Agropecuária e Agroenergia da Esalq**, pela realização da técnica de espectrometria de massas.

Ao **Departamento de Química-FFCLRP**, pelo seu Programa de Pós-Graduação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo suporte financeiro a este projeto de pesquisa.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que, embora não citados, contribuíram direta- ou indiretamente para a realização deste trabalho, através dos bons exemplos ou torcendo por mim.

*"O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o
período mais difícil da vida de alguém."*

Dalai Lama

Resumo

RESUMO

BERNARDI, A. V. **Identificação das principais enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar.** 2017. 94f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A biomassa do bagaço da cana-de-açúcar é composta de material lignocelulósico, principalmente celulose e hemicelulose, os quais são constituídos por açúcares de alta energia que podem ser convertidos a etanol. No entanto, a associação recalcitrante dessa biomassa impõe um grande desafio para a produção de biocombustíveis de segunda geração, devido à dificuldade em recuperar esses açúcares sob a forma de monômeros com elevado grau de pureza. Na natureza, muitos microrganismos realizam a degradação da biomassa de plantas através da ação de múltiplas CAZymes. Dentre esses, os fungos filamentosos se destacam devido a sua capacidade de produzir misturas enzimáticas altamente específicas para os substratos com que se deparam e, por essa razão, são a principal fonte das enzimas utilizadas nos coquetéis enzimáticos comercializados, em especial a espécie *T. reesei*. Contudo, esses coquetéis precisam ser otimizados e, para tanto, é necessário investir no estudo de outros fungos, como o *A. fumigatus*. Apesar de patogênico, o mesmo é considerado um importante produtor de enzimas lignocelulolíticas, cujas eficiências são aumentadas devido ao efeito sinérgico entre elas. Dessa forma, uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados por esse fungo durante a exposição a biomassas vegetais é necessária. Nesse sentido, a determinação das atividades de celulasas e xilanases após diferentes tempos de incubação foi realizada nos sobrenadantes das culturas do *A. fumigatus* crescido em SEB e em frutose, resultando em valores 21, 59 e 271 vezes maiores para as celulasas e 150, 541 e 74 vezes para as xilanases, após 24, 48 e 72 horas de cultivo, respectivamente, na presença do bagaço. Para verificar se as enzimas estavam efetivamente hidrolisando a biomassa, foi realizada a dosagem dos açúcares redutores nos sobrenadantes das culturas em SEB, tendo sido observado um aumento na concentração desses açúcares à medida que o tempo de exposição ao bagaço aumentava. Com o propósito de compreender o mecanismo envolvido na hidrólise do bagaço, foi realizada a análise transcricional do *A. fumigatus* por RNA-seq, quando esse fungo foi crescido na presença desse substrato, assim como em frutose. A análise dos dados revelou 144 CAZymes induzidas em SEB, frente a 65 reprimidas nessa biomassa. Dentre os genes induzidos, foram identificados muitos potencialmente envolvidos na desconstrução da lignocelulose, como aqueles que codificam endoglucanases, celobiohidrolases, glucosidades, xilanases, xilosidases, manosidases, LPMOs, pectinases, entre outros. Para verificar se essas proteínas estavam sendo secretadas pelo fungo, o secretoma do mesmo foi analisado por espectrometria de massas LC/MS. Com isso, identificou-se uma gama muito maior de proteínas na presença de SEB (130) em comparação ao crescimento em frutose (44), sendo a maioria CAZymes (59%). Todos esses resultados evidenciam o potencial do *A. fumigatus* na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, podendo suas enzimas contribuir para a produção de coquetéis enzimáticos mais eficientes e, conseqüentemente, para a produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*; bagaço de cana-de-açúcar; enzimas hidrolíticas; etanol de segunda geração; RNA-seq.

Abstract

ABSTRACT

BERNARDI, A. V. **Identification of main hydrolytic enzymes of *Aspergillus fumigatus* when grown in sugarcane bagasse.** 2017. 94f. Dissertation (Master's Degree). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Sugarcane bagasse biomass is composed of lignocellulosic material, mainly cellulose and hemicellulose, which are composed of high energy sugars that can be converted into ethanol. However, the recalcitrant association of this biomass imposes a major challenge for the production of second-generation biofuels, due to the difficulty in recovering these sugars in the form of monomers with high purity. In nature, many microorganisms perform the degradation of plant biomass through the action of multiple CAZymes. Among them, filamentous fungi stand out for their ability to produce highly specific enzymatic mixtures for the substrates they are in the presence of and, therefore, they are the main source of enzymes used in commercialized enzymatic cocktails, especially *T. reesei*. However, these cocktails need to be optimized and, for this reason, it is necessary to invest in the study of other fungi, such as the *A. fumigatus*. Although pathogenic, it is considered an important producer of lignocellulolytic enzymes, whose efficiencies are increased due to the synergistic effect between them. Thus, a better understanding about the mechanisms used by this fungus during exposure to plant biomass is necessary. In this sense, the determination of cellulases and xylanases activities after different incubation times was performed after collection of supernatants from *A. fumigatus* grown in SEB and fructose cultures, resulting in 21, 59 and 271-fold higher values for cellulases, and 150, 541 and 74-fold higher values for xylanases, after 24, 48 and 72 hours of cultivation, respectively, in presence of the bagasse. To verify if the enzymes were effectively hydrolyzing the biomass, the supernatants from SEB cultures were collected and the reducing sugars were quantified. An increase in the concentration of these sugars was observed as the exposure time to the bagasse increased. In order to understand the mechanism involved in bagasse hydrolysis, the transcriptional analysis of *A. fumigatus* grown in the presence of this substrate and in fructose was performed by RNA-seq. Data analysis revealed 144 CAZymes induced by SEB, compared to 65 repressed by this biomass. Among the induced genes, many potentially involved in the lignocellulose deconstruction, such as those encoding for endoglucanases, cellobiohydrolases, glucosidases, xylanases, xylosidases, mannosidases, LPMOs, pectinases, among others, were identified. To verify if these proteins were being secreted, the secretome of the fungus was analyzed by LC/MS mass spectrometry. Hence, a much larger range of proteins was identified in the presence of SEB (130) as compared to growth in fructose (44), most of them being CAZymes (59%). All these results show the potential of *A. fumigatus* in the hydrolysis of sugarcane bagasse and its enzymes can contribute to the production of more efficient enzymatic cocktails and, consequently, to the production of second-generation ethanol.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; sugarcane bagasse; hydrolytic enzymes; second-generation ethanol; RNA-seq.

1 Introdução

1 Introdução

1.1 Etanol de 2ª geração

Com a expansão populacional, o consumo de combustíveis tem se tornado cada vez maior e a estimativa é de que a demanda cresça ainda mais (McCann & Carpita, 2015; Sarkar *et al.*, 2012). Com relação à gasolina, o *National Energy Information Center* (NEIC) previu um aumento de aproximadamente 48% na demanda mundial de 2005 até 2025 (Nova Cana, fonte: www.novacana.com). Contudo, o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis é inevitável e os danos ambientais provocados pela emissão de gases de efeito estufa tornam-se cada vez mais preocupantes, aumentando gradativamente a necessidade de substituição por alternativas renováveis, sustentáveis e com menor impacto negativo ao meio ambiente (Sambusiti *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2015). Nesse sentido, o bioetanol constitui uma opção promissora, pois além de corresponder a todos esses quesitos, já é, atualmente, o principal biocombustível utilizado (Cheng & Timilsina, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol a partir da cana-de-açúcar, tendo sido responsável pela produção de mais de 30 bilhões de litros na safra 2015/2016 (Neves *et al.*, 2016; Unica, fonte: www.unicadata.com.br). Atualmente, a principal tecnologia utilizada é de primeira geração, que consiste na fermentação alcoólica, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a partir da sacarose presente no caldo extraído da cana-de-açúcar. Ao final da reação, é obtida uma mistura denominada vinho fermentado, na qual estão contidos açúcares não fermentados, leveduras e etanol. Esse último é, posteriormente, separado da mistura através do processo de destilação, obtendo-se o álcool hidratado utilizado como combustível (Borin *et al.*, 2015; Novacana, fonte: www.novacana.com).

Contudo, para suprir a demanda crescente e se tornar um potencial substituto para os combustíveis fósseis, são necessários investimentos em outras tecnologias de produção, como o etanol de 2ª geração que utiliza a biomassa lignocelulósica da parede celular de compostos de origem vegetal (Gnansounou *et al.*, 2015; Batalha *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2015). A lignocelulose constitui a matéria natural mais abundante do planeta e, por essa razão, vem sendo amplamente explorada pelas indústrias que visam a produção de biocombustíveis líquidos (Glass *et al.*, 2013). Dentre os principais compostos que podem ser utilizados para esse propósito estão incluídos resíduos agroindustriais, como palha de milho, palha de arroz, bagaço e palha de cana, entre outros, que são largamente produzidos todos os anos (Sarkar *et al.*, 2012).

No Brasil, grandes quantidades de subprodutos são geradas durante a sacarificação da cana, principalmente bagaço e palha, correspondendo a 2/3 do conteúdo energético da planta

(Pereira *et al.*, 2015). Dos 280 kg de bagaço gerados a cada tonelada de cana-de-açúcar, uma parte é empregada na geração de energia nas usinas de açúcar e destilarias de etanol, enquanto uma fração significativa permanece inexplorada (Batalha *et al.*, 2015). Desse modo, a utilização desse resíduo como substrato para produção de etanol 2G constitui uma alternativa vantajosa, pois além da grande disponibilidade, possui baixo custo, alto percentual de polissacarídeos, possibilita a produção durante períodos de entressafra, além de não competir com a indústria alimentícia (Borin, *et al.*, 2015; Sindhu *et al.*, 2015; Sambusiti, *et al.*, 2015).

Apesar desses benefícios, a lignocelulose é constituída por quatro polímeros principais – celulose, hemicelulose, lignina e pectina – cuja associação intrínseca lhe confere alta recalcitrância, dificultando o acesso aos seus açúcares simples, que incluem principalmente glicose e xilose (Gonçalves *et al.*, 2014; Glass *et al.*, 2013). Esse constitui um dos principais desafios encontrados na sua utilização para produção comercial de etanol 2G, pois para que esse biocombustível se torne um produto economicamente competitivo, é necessário que tanto a celulose quanto a hemicelulose sejam eficientemente convertidas a açúcares monoméricos passíveis de fermentação (de Souza *et al.*, 2011).

1.2 Biomassa lignocelulósica do bagaço da cana-de-açúcar

A biomassa lignocelulósica do bagaço da cana-de-açúcar é geralmente composta por 40-50% de celulose, 25-35% de hemicelulose, 15-20% de lignina e uma pequena porcentagem de outros componentes extraíveis (proteínas, lipídeos, etc) (Borin, *et al.*, 2015; Strakowska *et al.*, 2014). A proporção desses componentes é dependente da fonte da matéria-prima e do estágio de crescimento da planta, podendo variar até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (Arias *et al.*, 2016).

Como representado na *figura 1*, a celulose consiste em um polímero linear formado por 7000-15000 unidades de D-glicose, unidas umas às outras através de ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$ e interações de hidrogênio (Strakowska *et al.*, 2014). As cadeias de celulose interagem paralelamente entre si através de ligações de hidrogênio, formando fibrilas altamente cristalinas e insolúveis (Mood, *et al.*, 2013), podendo ser encontradas algumas regiões amorfas em sua estrutura (Strakowska *et al.*, 2014).

Figura 1. Imagem ilustrativa da estrutura da celulose, mantida através de ligações glicosídicas e interações de hidrogênio intra- e intermoleculares (Lu *et al.*, 2014).

As hemiceluloses são heteropolímeros ramificados, que podem ser compostos por pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose), ácidos urônicos (ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico) e ácido acético (Mood *et al.*, 2013; Canilha *et al.*, 2012). Na biomassa do bagaço, o componente mais abundante da hemicelulose é o glucuronoarabinoxilano (xilano), um polissacarídeo formado por uma cadeia principal de monômeros de D-xilose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ e por ramificações de L-arabinose e ácido D-glucurônico (Limayem & Ricke, 2012; Cortez *et al.*, 2010). Além dele, outros heteropolímeros que constituem a hemicelulose são os xiloglucanos e os galactomananos que, juntamente com o xilano, estão representados na *figura 2*. Ao contrário da celulose, as hemiceluloses possuem estrutura amorfa e, por essa razão, são mais susceptíveis à hidrólise (Mood *et al.*, 2013; van den Brink & de Vries, 2011).

Figura 2. Imagem ilustrativa dos três principais tipos de hemicelulose encontrados na biomassa do bagaço de cana-de-açúcar (Cortez *et al.*, 2010).

O terceiro componente majoritário é a lignina, um polímero irregular aromático altamente hidrofóbico, cuja hidrólise resulta na liberação de compostos fenólicos, os quais são inibidores do processo de fermentação. Sua estrutura é formada por três principais subunidades: guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil, cujas proporções variam dependendo da espécie da planta. A *figura 3.A* ilustra a estrutura de uma lignina em que se observa exclusivamente as subunidades guaiacil. A biossíntese desses três constituintes ocorre a partir dos álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico, respectivamente (*figura 3.B*) (Mood *et al.*, 2013; Brandt *et al.*, 2013; Canilha *et al.*, 2012).

Em vista de sua estrutura rígida, a lignina é o principal fator que confere resistência mecânica à parede celular das plantas, protegendo contra ataques biológicos (Badieli *et al.*, 2014; Canilha *et al.*, 2012).

Figura 3. A) Imagem ilustrativa de uma lignina composta exclusivamente por unidades guaiacil. B) Principais subunidades constituintes da lignina e seus respectivos álcoois precursores (Brandt *et al.*, 2013).

A mesma reveste o domínio celulose-hemicelulose, constituindo assim a estrutura recalcitrante característica da biomassa lignocelulósica da parede celular do bagaço, assim como de outros materiais de origem vegetal (Aro *et al.*, 2005), como representado na *figura 4*.

Figura 4. Imagem ilustrativa da associação recalcitrante entre celulose, hemicelulose e lignina na estrutura da parede celular vegetal (Brandt *et al.*, 2013).

1.3 Pré-tratamentos

Devido à recalcitrância da lignocelulose, são necessários pré-tratamentos (químicos, físico-químicos, mecânicos, biológicos ou combinações destes) que aumentem a susceptibilidade dos polissacarídeos à hidrólise enzimática para obtenção dos açúcares fermentáveis, podendo dessa forma aumentar a competitividade do etanol de segunda geração (Borin *et al.*, 2015; Behera, *et al.*, 2014; Cortez *et al.*, 2010).

De maneira geral, os pré-tratamentos objetivam quebrar e remover, parcialmente, a lignina e a hemicelulose, diminuir a cristalinidade da celulose, bem como aumentar a área superficial da matéria-prima. Dentre os inúmeros métodos que podem ser utilizados, estão incluídos explosão a vapor, utilização de ácido diluído, utilização de solventes orgânicos, tratamento alcalino, radiação de micro-ondas, entre outros, cada qual exercendo um efeito diferente sobre a estrutura e composição da biomassa (Behera *et al.*, 2014; Menon & Rao, 2012; Cortez *et al.*, 2010).

Figura 5. Representação do efeito geral dos pré-tratamentos sobre a biomassa lignocelulósica dos compostos vegetais (Mood, *et al.*, 2013).

Como demonstrado por Arias *et al.*, 2016, o pré-tratamento com ácido diluído de bagaço de cana-de-açúcar resultou principalmente na remoção da hemicelulose, enquanto o pré-tratamento alcalino atuou, principalmente, na remoção da lignina. Esses dois diferentes efeitos provocados sobre a biomassa, por sua vez, interferiram diretamente no rendimento da hidrólise enzimática, com aproximadamente 3 e 12 g L⁻¹ de glicose liberados, respectivamente. Além disso, após a combinação dos dois métodos, obteve-se um rendimento ainda maior, equivalente a 17 g L⁻¹. Com isso, enfatiza-se os diferentes efeitos dos pré-tratamentos sobre a lignocelulose e a vantagem de combiná-los, além de se ressaltar a importância da remoção da lignina para que se obtenha uma alta recuperação dos açúcares durante a hidrólise.

Embora existam métodos de pré-tratamentos efetivos, os mesmos ainda não são economicamente viáveis, correspondendo a uma das etapas de maior custo no processo de conversão da biomassa lignocelulósica a etanol, além de consumirem grandes quantidades de energia e gerarem inibidores da etapa de fermentação, como furfurais, HMFs e ácido acético (Neves *et al.*, 2016; Sindhu *et al.*, 2015; Behera *et al.*, 2014).

1.4 Hidrólise enzimática

A etapa de pré-tratamento não é o único fator responsável pela inviabilidade econômica da produção de etanol de segunda geração (Benjamin *et al.*, 2014). Embora existam tratamentos químicos, a hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada é preferível, uma vez que oferece condições reacionais mais suaves, rendimentos superiores, além de produzir menores quantidades de inibidores da fermentação (Shin *et al.*, 2011). Contudo, os coquetéis enzimáticos

atualmente utilizados (Celluclast[®], Cellic CTec2[®] e HTec2[®], Multifect[®], entre outros) apresentam altos custos e, por essa razão, a utilização dessa tecnologia ainda não é comercialmente competitiva com o modelo de produção atual (Rodrigues *et al.*, 2015; Benjamin *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2011). Uma maneira de reduzir os custos associados a essa etapa do processo é aumentar a eficiência das misturas enzimáticas comercializadas, através da suplementação com novas enzimas, provenientes de outros microrganismos (Couturier *et al.*, 2011).

Na natureza, vários microrganismos realizam a degradação da biomassa de plantas através da ação complementar e sinérgica de múltiplas enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes, *carbohydrate-active enzymes*), exercendo assim um papel essencial na reciclagem do carbono (Cragg *et al.*, 2015; Aro *et al.*, 2005). Dentre esses, os fungos filamentosos possuem destaque como uns dos mais eficientes degradadores em decorrência de seu sistema enzimático extracelular altamente específico pelos substratos com que se deparam, bem como sua capacidade de penetração nos substratos através de suas hifas, que permite uma colonização mais eficiente (Borin, *et al.*, 2015; Sharma & Arora, 2015; Culleton *et al.*, 2013). Por essa razão, os mesmos constituem a principal fonte das enzimas utilizadas nos coquetéis comercializados atualmente (Glass *et al.*, 2013).

As CAZymes são enzimas catalogadas no banco de dados CAZy (disponível em: www.cazy.org), responsáveis pela quebra, síntese e modificação de glicoconjugados, oligo- e polissacarídeos. As mesmas são agrupadas em cinco diferentes classes funcionais: glicosil hidrolases (GHs), glicosil transferases (GTs), carboidrato esterases (CEs), polissacarídeo liases (PLs) e enzimas com atividades auxiliares (AAs) (Ries *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Além disso, 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).

As enzimas que atuam na degradação da biomassa vegetal são aquelas pertencentes às classes GHs, que promovem a quebra das ligações glicosídicas entre carboidratos; CEs, que catalisam a des-O-acilação ou des-N-acilação de glicoconjugados; PLs, que degradam glicosaminoglicanos e pectina; e AAs, que atuam juntamente com as GHs através de um mecanismo de oxidorredução (Cragg *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2013).

Mais especificamente, as principais enzimas secretadas pelos fungos durante a degradação da celulose incluem endo-1,4- β -glucanases (GH5, GH7, GH12, GH45), celobiohidrolases/exoglucanases (GH6, GH7) e β -glicosidades (GH1, GH3) (Glass, *et al.*,

2013; van den Brink & de Vries, 2011). As endoglucanases catalisam o ataque inicial ao polímero de celulose, sendo responsáveis por hidrolisar as ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ presentes na região amorfa da cadeia, o que resulta na liberação de oligossacarídeos de cadeia longa (Liu *et al.*, 2011). As celobiohidrolases CBHI (GH7) e CBHII (GH6) atuam, respectivamente, nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia celulósica, liberando celobiose, cuja clivagem a monômeros de glicose é catalisada pelas β -glicosidases (Singhania *et al.*, 2013; van den Brink & de Vries, 2011) (figura 6).

Figura 6. Esquema representativo da ação sinérgica entre endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases (BG) na degradação da celulose a monômeros de glicose (d) (Guzakov, 2011).

As misturas enzimáticas envolvidas na desconstrução de xilano são mais variadas, dependendo dos resíduos ramificados à cadeia principal de xilose, e podem incluir principalmente endo-1,4- β -xilanases (GH10, GH11), α -L-arabinofuranosidases (GH3, GH10, GH43, GH51, GH54, GH62), β -xilosidases (GH3 e GH43), α -glucuronidases (GH67), acetilxilano esterases (CE1 e CE7) e ácido ferúlico esterases (CE1). Dentre essas enzimas, as

endo-1,4- β -xilanases atuam na clivagem da cadeia principal a oligossacarídeos menores que, por sua vez, são os substratos da clivagem catalisada pelas β -xilosidases, que resulta na liberação dos monômeros de xilose (Glass, *et al.*, 2013; Culleton *et al.*, 2013) (figura 7).

Figura 7. Representação da ação das enzimas envolvidas na degradação da cadeia principal do xilano, assim como na remoção dos seus substituintes (Glass *et al.*, 2013).

1.5 Potencial biotecnológico das espécies fúngicas

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, em especial a espécie *Trichoderma reesei*, têm sido o foco da maioria das pesquisas biotecnológicas relacionadas à degradação de celulose há mais de 50 anos. Ainda, devido ao seu potencial em secretar grandes quantidades de celulasas de alta eficiência, cuja mistura frequentemente excede 100 g L⁻¹, *T. reesei* tem sido o microrganismo padrão aplicado na produção comercial de enzimas hidrolíticas (Hasunuma *et al.*, 2013). Contudo, o sequenciamento do genoma desse fungo revelou que somente quatro principais enzimas celulolíticas são secretadas em quantidades significantes pelo mesmo (CBHI, CBHII, EGI e EGII), além da maioria das suas β -glicosidases serem intracelulares (Gusakov, 2011).

Quando comparado a *Aspergillus sp.*, o nível de produção de β -glicosidases extracelulares por *T. reesei*, bem como a tolerância dessas enzimas à inibição por glicose, são notavelmente mais baixos. Por essa razão, muitos coquetéis enzimáticos que utilizam principalmente celulasas desse fungo são suplementados com β -glicosidases derivadas de outros gêneros, como *Aspergillus* (Hasunuma *et al.*, 2013; Gusakov, 2011). Os resultados envolvendo a cepa 2ND de *Aspergillus fumigatus* demonstraram que uma mistura de celulasas complementada com hemicelulasas provenientes desse fungo proporcionou maior degradação da lignocelulose, em contraste à complementação com o coquetel Multifect®, cujas

hemicelulases são provenientes de *T. reesei* (Shin *et al.*, 2011). Adicionalmente, foi demonstrado que as celobiohidrolases do fungo padrão são altamente sensíveis à inibição por celobiose, o que torna necessário utilizar elevadas quantidades dessas enzimas nos coquetéis celulolíticos (van den Brinks & de Vries, 2011).

Além disso, o genoma de *T. reesei* apresenta um repertório menor de hemicelulases quando comparado a outros fungos filamentosos ascomicetos, como *N. crassa*, *A. fumigatus*, *M. grisea* e *F. graminearum*, além de um menor número de CAZymes contendo CBMs, que auxiliam no reconhecimento e ligação das enzimas aos seus substratos, consequentemente promovendo aumentos nas suas atividades (Couturier *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2008).

A eficiência de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando-se coquetéis enzimáticos isolados dos fungos filamentosos *T. harzianum*, *P. funiculosus* e *A. niger*, apresentou rendimentos equivalentes a 42, 66 e 1%, respectivamente. No entanto, a hidrólise na presença de uma mistura enzimática otimizada dos três fungos simultaneamente, apresentou rendimento de até 91%, o que pode ser justificado pela sinergia e complementação existentes entre as enzimas provenientes das três fontes distintas. Embora o coquetel isolado de *A. niger* não seja capaz de efetuar uma hidrólise estatisticamente significativa do material, devido aos baixos níveis de atividades de endo- e exoglucanases, uma vez associado aos outros dois coquetéis, seus altos níveis de β -glucosidases contribuíram para que se atingisse uma eficiência de hidrólise muito maior (Arias *et al.*, 2016).

Assim, todos esses fatos apontam para a existência de outros fungos com eficiências equivalentes ou superiores à *T. reesei* na degradação da parede celular vegetal, bem como reforçam a necessidade de se explorar mais profundamente o potencial biotecnológico de outras espécies.

1.6 *Aspergillus fumigatus*

Inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de otimizar os coquetéis enzimáticos comercializados atualmente e, com isso, reduzir os custos associados a essa etapa da produção de etanol de segunda geração (Kang *et al.*, 2004). Nesse sentido, estudos sobre os fungos do gênero *Aspergillus* vêm ganhando cada vez mais destaque devido à habilidade dos mesmos em secretar enzimas hidrolíticas de interesse para as biorrefinarias lignocelulósicas (Liu *et al.*, 2013). Esse grupo de fungos filamentosos ascomicetos engloba mais de 250 espécies, sendo o *A. fumigatus* uma das mais comuns e abundantes, encontrada principalmente em materiais em decomposição (Rokas *et al.*, 2012). Essa espécie apresenta crescimento ótimo a 37 °C e em pH variando de 3,7 a 7,6, contudo, pode ser encontrada em ambientes cujas faixas

de temperatura e pH variem de 12 a 65 °C e 2,1 a 8,8, respectivamente (Kwon-Chung & Sugui, 2013).

O *A. fumigatus* é um fungo termofílico, saprofítico e patogênico, sendo o principal responsável pelas infecções provocadas pelo gênero, denominadas aspergiloses, que acometem principalmente pacientes imunocomprometidos (Kwon-Chung & Sugui, 2013; Rokas *et al.*, 2012). Um dos principais fatores que justificam sua elevada patogenicidade está relacionado às características físicas dos seus esporos ou conídios, que constituem a principal forma de reprodução dessa espécie (Kwon-Chung & Sugui, 2013; O’Gorman *et al.*, 2009). Os mesmos apresentam coloração verde-acinzentada e um diâmetro variando de 2 a 3 µm, que constitui um tamanho ideal para adentrar as vias aéreas inferiores do hospedeiro, onde geralmente se iniciam as infecções sistêmicas. Além disso, a superfície conidial do *A. fumigatus* contém um número maior de resíduos de ácido siálico com carga negativa expostos quando comparado aos demais indivíduos do gênero, sendo os mesmos responsáveis por mediar, parcialmente, a ligação às proteínas da lâmina basal do hospedeiro o que, portanto, torna a adesão dos conídios dessa espécie ao tecido epitelial de vias aéreas e alvéolos mais efetiva (Kwon-Chung & Sugui, 2013).

Figura 8. Imagem microscópica do fungo *Aspergillus fumigatus* (Disponível em: www.aspergillus.org.uk).

Apesar da sua patogenicidade, esse fungo tem demonstrado potencial para a degradação de materiais lignocelulósicos, com capacidade de se tornar um importante produtor de enzimas com aplicabilidade na indústria bioenergética, podendo contribuir para a produção de coquetéis enzimáticos mais eficientes. Análises dos secretomas da cepa Z5 de *A. fumigatus* cultivada na presença de três diferentes fontes de carbono (glicose, avicel e palha de arroz) demonstraram uma produção aumentada de lignocelulases no meio contendo palha de arroz, em oposição à repressão na produção dessas enzimas pela glicose (Liu *et al.*, 2013). Da mesma forma, a indução do crescimento de *A. fumigatus* LF9 em outras fontes de carbono como celulose, xilano

e amido resultou em uma maior abundância de xilanases, xilosidases, arabinofuranosidases e acetilxilano esterases na presença de xilano, enfatizando a produção de misturas enzimáticas específicas a uma determinada condição por esse fungo (Adav *et al.*, 2015 (1)). Ainda é importante ressaltar que ao comparar os genomas de *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *T. reesei*, pode-se observar 263, 247 e 200 genes codificantes de glicosil hidrolases, respectivamente. Do mesmo modo, o número genes que codificam hemicelulases foi maior para o *A. fumigatus* (36), em comparação às espécies *A. nidulans* (35) e *T. reesei* (16), reforçando mais uma vez o potencial desse fungo para a busca de enzimas hidrolíticas (Adav *et al.*, 2015 (2)).

A obtenção de enzimas termoestáveis e termoativas tem sido visada, em vista dos benefícios de se realizar a hidrólise de biomassas lignocelulósicas em temperaturas elevadas. Dentre essas vantagens, pode-se citar o aumento e a diminuição, respectivamente, da solubilidade e da viscosidade dos substratos, redução da necessidade de arrefecimento após pré-tratamentos hidrotérmicos, assim como a diminuição no risco de contaminação bacteriana durante o processo de sacarificação. Nesse contexto, o *A. fumigatus* caracteriza-se pela secreção de inúmeras glicosil hidrolases com elevada estabilidade térmica, como β -glicosidases, endoglucanases, β -xilosidases, endo- β -1,4-xilanases e celobiohidrolases (Santos *et al.*, 2015; Moroz *et al.*, 2015).

O sequenciamento de rDNA da microbiota isolada de bagaço de cana-de-açúcar obtido do cerrado brasileiro permitiu identificar cepas mesofílicas e termofílicas de fungos, dentre os quais o *A. fumigatus* foi a espécie predominante, ressaltando a característica termofílica do mesmo, além da sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas (Santos *et al.*, 2015).

De modo a investigar o potencial de microrganismos na degradação da lignocelulose, novos métodos moleculares, envolvendo análises do genoma, transcriptoma e proteoma de fungos e bactérias, vêm sendo abordados (López-Mondéjar *et al.*, 2016; Baldrian & López-Mondéjar, 2014). Assim, com o propósito de explorar a eficiência da despolimerização de matrizes lignocelulósicas por *A. fumigatus* e identificar os genes e proteínas potencialmente envolvidos na hidrólise desses materiais, foi realizada a análise do perfil transcricional e das proteínas secretadas pelo fungo. O transcriptoma foi obtido através da técnica de RNA-seq, quando o mesmo foi exposto a bagaço de cana-de-açúcar explodido como única fonte de carbono. Trabalhos empregando esse método na análise de fungos filamentosos como *A. fumigatus*, *A. niger* e *T. harzianum* já foram publicados e relataram êxito em seus resultados (Irmer *et al.*, 2015; Horta *et al.*, 2014; Pullan *et al.*, 2014; Delmas *et al.*, 2012; Rokas *et al.*, 2012). As proteínas presentes no secretoma do fungo, por sua vez, puderam ser identificadas utilizando-se o sistema acoplado LC/MS. A espectrometria de massas é muito utilizada nesse

tipo de análise, já tendo sido aplicada na determinação do proteoma de fungos filamentosos como *T. reesei*, *A. niger*, *A.oryzae* e *A. terreus*, assim como outras cepas de *A. fumigatus*, crescidos sobre diferentes substratos (Adav *et al.*, 2015; Borin *et al.*, 2015; Adav *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2010; Oda *et al.*, 2006).

5 Conclusões

5 Conclusões

Através dos resultados obtidos com as análises do transcriptoma e do secretoma do fungo *Aspergillus fumigatus* cultivado na presença de bagaço de cana-de-açúcar explodido, assim como nos experimentos paralelos de determinação das atividades enzimáticas e açúcares redutores, foi possível chegar às seguintes considerações:

- O fungo *Aspergillus fumigatus* é capaz de se desenvolver na presença de biomassas complexas, como o bagaço de cana-de-açúcar;
- As xilanases secretadas possuem atividades superiores às determinadas para o fungo padrão *T. reesei*;
- O perfil transcricional do fungo é completamente distinto quando o mesmo é submetido a fontes de carbono com complexidades distintas, como a frutose e o bagaço, com número e variedade de genes codificantes de enzimas hidrolíticas e acessórias muito superiores na presença da biomassa lignocelulósica;
- A análise do secretoma do fungo demonstrou a habilidade do mesmo em secretar celulasas e hemicelulasas, além de outras CAZymes, importantes para o processo de degradação da parede celular vegetal, tendo sido muitas delas identificadas também no transcriptoma.

Todos esses pontos conduzem à conclusão final de que essa espécie de fungo filamentoso apresenta excelência na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, as quais podem auxiliar na otimização dos coquetéis enzimáticos atualmente comercializados, podendo contribuir para contornar um dos obstáculos associados à produção comercialmente viável de etanol de segunda geração.

Referências

REFERÊNCIAS

- Adav, S. S.; Li, A. A.; Manavalan, A.; Punt, P. & Sze, S. K. Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. *J Proteome Res.*, 9(8):3932-40, 2010.
- Adav, S. S.; Chao, L. T.; Sze, S. K. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Mol Cell Proteomics*, 11(7), 2012.
- Adav, S. S.; Ravindran, A. & Sze, S. K. Data for iTRAQ secretomic analysis of *Aspergillus fumigatus* in response to different carbon sources. *Data in Brief*, p.175-179, 2015. (1)
- Adav, S. S.; Ravindran, A. & Sze, S. K. Quantitative proteomic study of *Aspergillus fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes. *J Proteomics*, 119:154-168, 2015. (2)
- Arias, J. M.; Modesto, L. F. A.; Polikarpov, I. & Pereira Jr., N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. *Biotechnol Prog.*, 32(5):1222-29, 2016.
- Aro, N.; Pakula, T. & Penttilä, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.*, 29:719-739, 2005.
- Badiei, M.; Asim, N.; Jahim, J. M. & Sopian, K. Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. *APCBEE Procedia*, 9:170-4, 2014.
- Baldrian, P. & López-Mondéjar, R. Microbial genomics, transcriptomics and proteomics: new discoveries in decomposition research using complementary methods. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 98:1531-37, 2014.
- Batalha, L. A. R.; Han, Q.; Jameel, H.; Chang, H.; Colodette, J. L. & Gomes, F. J. B. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. *Bioresource Technol.*, 180:97-105, 2015.
- Beeson, W. T.; Vu, V. V.; Span, E. A.; Phillips, C. M. & Marletta, M. A. Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases. *Annu Rev Biochem.*, 84:923-946, 2015.
- Behera, S.; Arora, R.; Nandhagopal N. & Kumar, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew Sust Energ Rev.*, 36:91-106, 2014.
- Benjamin, Y.; García-Aparicio, M. P. & Görgens, J. F. Impact of cultivar selection and process optimization on ethanol yield from different varieties of sugarcane. *Biotechnol Biofuels*, 2014.
- Benoit, I.; Culleton, H.; Zhou, M.; DiFalco, M.; Osorio-Aguilar, G.; Battaglia, E.; Bouzid, O.; Brouwer, C. P. J. M.; El-Bushari, H. B. O.; Coutinho, P. M.; Gruben, B. S.; Hildén, K. S.; Houbaken, J.; Barboza, A. J.; Levasseur, A.; Majoor, E.; Mäkelä, M. R.; Narang, H.; Trejo-Aguilar, B.; van den Brink, J.; vanKuyk, P. A.; Wiebenga, A.; McKie, V.; McCleary, B.; Tsang, A.; Henrissat, B. & de Vries, R. P. Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. *Biotechnol Biofuels*, 8:107, 2015.

- Borin, G. P.; Sanchez, C. C.; de Souza, A. P.; de Santana, E. S.; de Souza, A. T.; Leme, A. F. P.; Squina, F. M.; Buckeridge, M.; Goldman, G. H. & Oliveira, J. V. C. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *Plos One*, 10(6):e0129275, 2015.
- Brandt, A.; Gräsvik, J.; Hallett, J. P.; Welton, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green chem.*, 15:550-583, 2013.
- Busk, P. K.; Lange, M.; Pilgaard, Bo. & Lange, L. Several genes encoding enzymes with the same activity are necessary for aerobic fungal degradation of cellulose in nature. *Plos One*, 9(12):e114138, 2014.
- 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. *J Biomed Biotechnol.*, 2012. 15p.
- Cheng, J. J. & Timilsina, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. *Renew Energ.*, 36:3541-49, 2011.
- 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.
- Couturier, M.; Haon, M.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B.; Lesage-Meessen, L. & Berrin, J. *Podospira anserina* hemicellulases potentiate the *Trichoderma reesei* secretome for saccharification of lignocellulosic biomass. *Appl Environ Microbiol.*, 77(1):237-246, 2011.
- Cragg, S. M.; Beckham, G. T.; Bruce, N. C.; Bugg, T. D. H.; Distel, D. L.; Dupree, P.; Etxabe, A. G.; Goodell, B. S.; Jellison, J.; McGeehan, J. R.; McQueen-Mason, S. J.; Schnorr, K.; Walton, P. H.; Watts, J. E. M. & Zimmer, M. Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life. *Curr Opin Chem Biol.*, 29:108-119, 2015.
- 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*? *Biotechnol J.*, 8:884-894, 2013.
- Delmas, S.; Pullan, S. T.; Gaddipati, S.; Kokolski, M.; Malla, S.; Blythe, M. J.; Ibbett, R.; Campbell, M.; Liddell, S.; Aboobaker, A.; Tucker, G. A. & Archer, D. B. Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. *Plos Genetics*, 8(8):e1002875, 2012.
- Daly, P.; van Munster, J. M.; Kokolski, M.; Sang, F.; Blythe, M. J.; Malla, S.; Oliveira, J. V. C.; Goldman, G. H. & Archer, D. B. Transcriptomic responses of mixed cultures of ascomycete fungi to lignocellulose using dual RNA-seq reveal inter-species antagonism and limited beneficial effects on CAZyme expression. *Fungal Genet Biol.*, 2016. In press.
- De Souza, W. R.; de Gouvea, P. F.; Savoldi, M.; Malavazi, I.; Bernardes, L. A. S.; Goldman, M. H. S.; de Vries, R. P.; Oliveira, J. V. C. & Goldman, G. H. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. *Biotechnol Biofuels*, 4:40, 2011.
- De Vries, R. P. & Visser, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 65:497-522, 2001.

- Gibbons, J. G.; Beauvais, A.; Beau, R.; McGary, K. L.; Latgé, J.; Rokas, A. Global transcriptome changes underlying colony growth in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 11:68–78, 2012.
- Glass, N. L.; Schmoll, M.; Cate, J. H. D. & Coradetti, S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annu Rev Microbiol.*, 67:477-498, 2013.
- Gnansounou, E.; Vaskan, P. & Pachón, E. R. Comparative techno-economic assessment and LCA of selected integrated sugarcane-based biorefinaries. *Bioresource Technol.*, 196:364-375, 2015.
- Gonçalves, D. L.; Matsushika, A.; de Sales, B. B. & Goshima, T. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme Microb Technol.*, 63:13-20, 2014.
- Guillén, D.; Sánchez, S. & Rodríguez-Sanoja, R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 85:1241-49, 2010.
- Gusakov, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Cell Press*, 29(9), 2011.
- Han, M.; Kim, N.; Lee, S. Y. & Chang, H. N. Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. *Curr Genet.*, 56:369-382.
- Hasunuma, T.; Okasaki, 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 Tech.*, 135:513-522, 2013.
- Horta, M. A. C.; Vicentini, R.; Delabona, P. S.; Laborda, P.; Crucello, A.; Freitas, S.; Kuroshu, R. M.; Polikarpov, I.; Pradella, G. C. & Souza, A. P. Transcriptome profile of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 induced by sugarcane bagasse. *Plos One*, 9(2):e88689, 2014.
- Irmer, H.; Tarazona, S.; Sasse, C.; Olbermann, P.; Loeffler, J.; Krappmann, S.; Conesa, A. & Braus, G. H. RNAseq analysis of *Aspergillus fumigatus* in blood reveals a just wait and see resting stage behavior. *BMC Genomics*, 16:640, 2015.
- Kang, S. W.; Park, Y. S.; Lee, J. S.; Hong, S. I. & Kim, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.*, 91:153-6, 2004.
- Kniemeyer, O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: the medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics*, 11:3232-43, 2011.
- Kwon-Chung, K. J. & Sugui, J. A. *Aspergillus fumigatus* – What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *Plos Pathog.*, 9(12):e1003743, 2013.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-5, 1970.
- Limayem, A. & Ricke, S. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust Sci.*, 38:449-467, 2012.
- 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. *Biotechnol Biofuels*, 6:149, 2013.

- 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 Expr Purif.*, 79:176–186, 2011.
- López-Mondéjar, R.; Zühlke, D.; Větrovský, T.; Becher, D.; Riedel, K. & Baldrian, P. Decoding the complete arsenal for cellulose and hemicellulose deconstruction in the highly efficient cellulose decomposer *Paenibacillus* O199. *Biotechnol Biofuels*, 9:104, 2016.
- Lu, B.; Xu, A. & Wang, J. Cation does matter: how cationic structure affects the dissolution of cellulose in ionic liquids. *Green Chem.*, 16:1326-35, 2014.
- Martinez, D.; Berka, R. M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M., *et al.* Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnol.*, 26(5):553-560, 2008.
- McCann, M. C. & Carpita, N. C. Biomassa recalcitrance: a multi-scale, multi-factor and conversion-specific property. *J Exp Bot.*, 2015.
- Menon, V. & Rao, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinary concept. *Prog Energy Combust Sci.*, 38:522-550, 2012.
- Miao, Y.; Li, J.; Xiao, Z.; Shen, Q. & Zhang, R. Characterization and identification of the xylanolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* Z5. *BMC Microbiol*, 15:126, 2015. (1)
- 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*, 16:459, 2015. (2)
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.*, 31(3):426-8, 1959.
- 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 focus on pretreatment. *Renew Sust Energ Rev.*, 27:77-93, 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 Crystallogr F Struct Biol Commun.*, 71(Pt.1):114-120, 2015.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 5ed. New York: *W. H. Freeman and Company*, 2008.
- 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 technologies. *Bioresource Technology*, 208:184-194, 2016.
- Nierman, W. C.; Pain, A.; Anderson, M. J.; Wortman, J. R., *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438:1151-56, 2005.
- Nova Cana, fonte: www.novacana.com.
- Oda, K.; Kakizono, D.; Yamada, O.; Iefuji, H.; Akita, O. & Iwashita, K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microbiol.*, 72(5):3448-57, 2006.

- Oliveira, J. M.; van Passel, M. W.; Shaap, P. J. & de Graaff, L. H. Proteomic analysis of the secretory response of *Aspergillus niger* to D-maltose and D-xylose. *Plos One*, 6(6):e20865, 2011.
- Pereira, S. C.; Maehara, L.; Machado, C. M. M. & Farinas, C. S. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnol Biofuels*, 2015.
- Pullan, S. T.; Daly, P.; Delmas, S.; Ibbett, R.; Kokolski, M.; Neiteler, A.; van Munster, J. M.; Wilson, R.; Blythe, M. J.; Gaddipati, S.; Tucker, G. A. & Archer, D. B. RNA-sequencing reveals the complexities of the transcriptional response to lignocellulosic biofuel substrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Biol Biotechnol.*, 1(1):1-14, 2014.
- Ries, L.; Pullan, S. T.; Delmas, S.; Malla, S.; Blythe, M. & Archer, D. B. Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*, 2013.
- Rocha, V. A. L.; Maeda, R. N. & Pereira Jr., N. Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. *Biotechnol Prog.*, 32(2):327-336, 2016
- Rodrigues, A. C.; Haven, M. Ø.; Lindedam, J.; Felby, C. & Gama, M. Celluclast and Cellic® Ctec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme Microb Technol*, 79:70-77, 2015.
- 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*. *Ann N Y Acad Sci.*, 1273(1):25-34, 2012.
- Sambusiti, C.; Licari, A.; Solhy, A.; Aboulkas, A.; Cacciaguerra, T. & Barakat, A. One-Pot dry chemo-mechanical deconstruction for bioethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technol.*, 181:200-6, 2015.
- Santos, B. S. L.; Gomes, A. F. S.; Franciscan, E. G.; Oliveira, J. M. & Baffi, M. A. Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. *Braz J Microbiol.*, 46(3):903-910, 2015.
- Sarkar, N.; Ghosh, S. K.; Bannerjee, S. & Aikat, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energy*, 37:19-27, 2012.
- Sharma, R. K.; Arora, D. S. Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality. *Crit Rev Microbiol.*, 41(1):52-60, 2015.
- Shin, H.; Vo, T. & Chen, R. Novel *Aspergillus* Hemicellulases Enhance Performance of commercial cellulases in lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol Prog*, 27(2), 2011.
- Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technol.*, 2015.
- Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Sukumaran, R. K.; Larroche, C. & Pandey, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technol.*, 127:500-7, 2013.
- Strakowska, J.; Blaszczyk, L. & Chelkowski, J. The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *J Basic Microbiol.*, 54:2-13, 2014.

van den Brink, J. & de Vries, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 91:1477-92.

Zhao, Z.; Liu, H.; Wang, C. & Xu, J. Correction: Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, 15:6, 2014.