FÁBIO DE SOUZA GARCIA

ENZIMAS OXIDORREDUTASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, do Instituo de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2018

FÁBIO DE SOUZA GARCIA

ENZIMAS OXIDORREDUTASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, do Instituo de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde.

Versão original

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Garcia, Fábio de Souza
Enzimas oxidorredutases produzidas por fungos filamentosos / Fábio de Souza Garcia; orientador Felipe Santiago Chambergo Alcalde. -- São Paulo, 2018.
170 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Lignocelulose. 2. Oxidorredutases. 3. Lacase. 4. Fungos. 5. Cana-de-açúcar. I. Chambergo Alcalde, Felipe Santiago, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Biotecnológicas

---

Candidato(a): Fábio de Souza García.

Título da Dissertação: Enzimas oxidorredutases produzidas por fungos filamentosos

Orientador(a): Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde.

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada em ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

São Paulo, 21 de julho de 2015.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Felipe S. Chambergo
Orientador do projeto de Mestrado: "Estudo e caracterização de enzimas oxidases produzidas por fungos filamentosos em bagaço de cana-de-açúcar"

Prezado Professor,

De acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, somente estão sujeitos à análise pelo CEUA os projetos de pesquisa ou atividade de ensino que envolvam animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata. Dessa forma, declaro que o referido estudo não se enquadra nessas normas e, portanto, não está sujeito à análise ou aprovação por esse CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Fabiana de Sant'Anna Evangelista
Coordenadora do Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação - CEUA
Escola de Artes, Ciências e Humanidades
Universidade de São Paulo

Dedicado a Aurora Garcia e a todos os que de alguma forma me ajudaram ao longo desses 26 anos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Universidade de São Paulo, em especial ao meu orientador Felipe Santiago Chambergo Alcalde, pela oportunidade dada e por todos os ensinamentos na área da pesquisa e da docência; e a CAPES pela oportunidade e apoios financeiro e acadêmico para o desenvolvimento desse trabalho.

À Carla Montanari Mergel e Anny Ayumi Iogi por terem ajudado em momentos fundamentais do projeto e a todos os demais colegas e amigos de laboratório, Beatriz Pereira, Patricia Adriani, Gabriel Oliveira, Adriana Sanchez, Suelen Sampaio, Isabela Caldeira, Jenifer e Nathalia por sempre ajudarem nas horas de dificuldade e por terem proporcionado grandes momentos ao longo desses anos.

À minha "mentora" de iniciação científica, Sabina Mozer Tralamazza por ter me dado a primeira oportunidade de ingressar na área da pesquisa e a todos os ensinamentos e lições, que me permitiram amadurecer nos dias de hoje.

À Rodrigo Bikelis, Thiago Bikelis, e Lorraine Fengler por todo o incentivo e força dada durante a procura do mestrado, pela grande amizade e por toda a evolução de consciência proporcionada nesses anos.

À meus pais, Mario Wilson Garcia e Patricia de Souza Garcia por toda a luta e por terem possibilitado a mim de chegar até aqui. A minha tia Márcia Garcia por sempre ter me incentivado nos estudos, às minhas irmãs Amanda, Vitória e Ana Clara e a todos os meus familiares.

À todos os amigos dos tempos de graduação, em especial a Fátima Nunes Sato, Joyce Garcia, Emelyn Febbe Rocha, Ana Paula Akemi e Fernanda Ferreira pela duradoura amizade e por todos os momentos inesquecíveis.

À todos os grandes professores que tive até hoje, em especial a Jorge Titon pelas aulas inesquecíveis de história e Marilda, por sempre incentivar seus alunos a evoluirem e ingressar na universidade. Aos meus professores de cursinho, Tony Manzi, Márcio Haga e Alexandre Takata por me mostrarem que o estudo e o ensino pode ser algo que divirta e alimente a alma do aluno e a meus professores de graduação, Julio Fernandes, Benedito Kushinski, Humberto Valvassori, Mario Sérgio e tantos outros pelas aulas incríveis e toda a influência em minha formação profissional e pessoal.

À Thiago Rodrigues, Celso Kotani e Jhonatan Cirino, meus irmãos desde os tempos de colégio e a todos os amigos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Enfim agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram com a minha formação ao longo desses anos e possibilitaram a execução desse projeto.

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio institucional da CAPES e da FAPESP (processo BIOEN-FAPESP 2014/24107-1)

RESUMO

GARCIA, F. S. **Enzimas oxidorredutases produzidas por fungos filamentosos**. 2018. 170 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Por sua capacidade de produzir e secretar uma mistura de enzimas durante seu crescimento em material lignocelulósico os fungos filamentosos são reconhecidos como importantes organismos no processo de degradação de biomassa. Porém, o processo demonstra-se limitado, uma vez que o polímero de lignina dificulta o acesso das enzimas celulolíticas a estrutura da celulose. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi identificar fungos filamentosos capazes de produzir enzimas oxidorredutases e avaliar sua utilização em complemento a enzimas celulases de *Trichoderma reesei* no processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Cepas de fungos foram avaliadas quanto a sua capacidade em degradar compostos modelo de lignina, permitindo a seleção e identificação do fungo *Pestalotiopsis* sp., um ascomiceto com grande importância em biotecnologia. O fungo foi avaliado quanto a sua capacidade de produzir enzimas oxidorredutases e celulases. Os resultados mostraram uma maior atividade da enzima lacase (7,18 U/mg ao 6° dia de cultivo) em relação as outras enzimas estudadas. Os sobrenadantes de *T. reesei* e *Pestalotiopsis* sp. foram concentrados 5x e utilizados no ensaio final de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. O coquetel enzimático produzido a partir da mistura do sobrenadante de *T. reesei* como o sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp. produziu maior quantidade de açúcares redutores, gerando 15,52 g/L contra 12,29 g/L da amostra controle após 24 horas. Além disso, foi avaliada a atividade enzimática durante o processo de sacarificação. Constatou-se que no coquetel enzimático ocorre um aumento na atividade de celulases em relação ao controle durante as primeiras 6 horas de reação, podendo estar relacionado a despolimerização da lignina pelas enzimas oxidorredutases. Concluiu-se que para a produção de coquetéis enzimáticos mais eficientes para a degradação da biomassa vegetal, podem ser combinados diferentes grupos de enzimas provenientes de diferentes fungos. Assim, são necessários mais estudos acerca do papel de diferentes enzimas durante o processo e a identificação de novos microrganismos e seus perfis de secreção.

Palavras-chave: Lignocelulose. Oxidorredutases. Lacase. Fungos. Cana-de-açúcar.

ABSTRACT

GARCIA, F. S. **Oxidoreductase enzymes from filamentous fungi**. 2018. 170 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Due to its capacity to produce and secrete a mixture of enzymes during its growth in lignocellulosic material the filamentous fungi are recognized as important organisms in the process of degradation of biomass. However, the process is shown to be limited, since the lignin polymer hinders the access of cellulolytic enzymes to the cellulose structure. In this context, the objective of the present study was to identify filamentous fungi capable of producing oxidoreductase enzymes and to evaluate its use in complement to the enzymes cellulases of *Trichoderma reesei* in the saccharification process of sugarcane bagasse. Fungi strains were evaluated for their ability to degrade lignin model compounds, allowing the selection and identification of the fungus *Pestalotiopsis* sp., an ascomycete with great importance in biotechnology. The fungus was evaluated for its ability to produce oxidoreductase enzymes and cellulases. The results showed a higher activity of the enzyme laccase (7.18 U / mg) at the 6th day of culture in relation to the other enzymes studied. Supernatants of *T. reesei* and *Pestalotiopsis* sp., were concentrated 5x and used in the final saccharification test of sugarcane bagasse. The enzymatic cocktail produced from the mixture of *T. reesei* and *Pestalotiopsis* sp. supernatants produced a higher amount of reducing sugars, generating 15.52 g / L against 12.29 g / L of the control sample after 24 hours. In addition, the enzymatic activity during the saccharification process was evaluated. It was observed that in the enzymatic cocktail there is an increase in cellulase activity in relation to the control during the first 6 hours of reaction, and may be related to depolymerization of lignin by oxidoreductases enzymes. It was concluded that for the production of more efficient enzymatic cocktails for the degradation of the vegetal biomass, different groups of enzymes from different fungi can be combined. Thus, further studies are needed on the role of different enzymes during the process and the identification of new microorganisms and their secretion profiles.

Keywords: Lignocellulose. Oxidoreductases. Laccase. Fungi. Sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura química da celulose..... 19
Figura 2 - Representação da estrutura química da hemicelulose..... 20
Figura 3 - Representação da estrutura química da lignina..... 22
Figura 4 - Ciclo catalítico de reação mediada pela enzima lacase..... 28
Figura 5 - Representação do ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase..... 30
Figura 6 - Representação do mecanismo de ação da enzima lignina peroxidase.... 31
Figura 7 - Ensaio de atividade enzimática em fungos filamentosos..... 56
Figura 8 - Características morfológicas do fungo *Pestalotiopsis* sp..... 59
Figura 9 - Eletroforeses de DNA do fungo *Pestalotiopsis* sp. em gel de agarose 1%..... 60
Figura 10 - Atividade específica de oxidorredutases (A) e celulases (B) do fungo *Pestalotiopsis* sp..... 65
Figura 11 - Atividade específica de celulases do fungo *T. reesei* QM9414..... 69
Figura 12 - Determinação e purificação de enzimas produzidas pelo fungo *Pestalotiopsis* sp..... 70
Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%)..... 72
Figura 14 - Atividade específica de enzimas oxidorredutases do fungo *Pestalotiopsis* sp. (A) e celulases do fungo *Pestalotiopsis* sp. (B) durante cultivo em bagaço de cana-de-açúcar e celulases de *T. reesei* (C) durante cultivo em avicel 1%..... 77
Figura 15 - Açúcares redutores liberados durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar..... 79
Figura 16 - Atividade enzimática de celulases e oxidorredutases durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na identificação da cepa em estudo. 47
Tabela 2 - Condições de PCR realizados no estudo..... 48
Tabela 3 - Determinação de atividade enzimática em fungos filamentosos... 56
Tabela 4 - Identificação por análise comparativa da sequência de rDNA do fungo *Pestalotiopsis* sp..... 61
Tabela 5 - Condições de cultura e açúcares obtidos em diferentes ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar..... 75
Tabela 6 - Atividade específica de enzimas presentes nos sobrenadantes provenientes dos fungos *T. reesei* e *Pestalotiopsis* sp. a serem utilizados na preparação do coquetel enzimático para o ensaio final de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar..... 78
Tabela 7 - Ensaios de sacarificação e misturas enzimáticas utilizadas em diferentes condições e diferentes substratos..... 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BBF - Bioquímica, biotecnologia, fungo
BGL - β-Glicosidase
BNDES - Banco nacional de desenvolvimento
CBH - Celobiohidrólase
CE - Esterase de carboidratos
CMC: Carboxi metil celulose
CONAB - Companhia nacional de abastecimento
CTAB - Cetyl trimetyl ammonium bromide
DMP - 2,6-dimethoxyphenol
DMPPDA - Dimethyl-4-phenylenediamine
E2G - Etanol de segunda geração
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
EGL - Endoglunacase
GH - Glicosídeo hidrólase
HAP - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
LiP - Lignina peroxidase
MCO - Multicobre oxidase
MiP - Peroxidase independente de manganês
MnP - Manganês peroxidase
P&D - Pesquisa e desenvolvimento
PL - Polissacarídeo-liase
PMO - Polissacarídeo monoxigenase
SDS - Sodium dodecil sulfate
U/L - Unidades de enzima
U/mg - Unidades de enzima por miligrama de proteína
VP - Versátil peroxidase

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO 16
1 Revisão de literatura. 17
1.1 Lignocelulose 17
1.2 Degradação da lignocelulose e processos biotecnológicos 23
1.3 Enzimas oxidorredutases 25
1.3.1 Lacase (EC 1.10.3.2) 26
1.3.2 Manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) 29
1.3.3 Lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) 30
1.4 Fungos filamentosos e enzimas com aplicação em biotecnologia 32
1.4.1 Pestalotiopsis sp 35
1.4.2 Trichoderma reesei 37
1.5 Sacarificação da lignocelulose e coquetéis enzimáticos 39
II OBJETIVOS 42
2.1 Objetivos gerais 42
2.2 Objetivos específicos 42
III METODOLOGIA 43
3.1 Cepas e condições de cultura 43
3.2 Técnicas gerais de bioquímica e biologia molecular 44
3.3 Seleção de fungos produtores de enzimas oxidorredutases e celulases 44
3.3.1 Detecção de atividade oxidorredutase em placa 44
3.3.2 Detecção de atividade celulase em placa 45
3.4 Identificação taxonômica e molecular do fungo em estudo 45
3.4.1 Identificação morfológica 45
3.4.2 Identificação molecular 45
3.5 Determinação de curvas padrão 49
3.5.1 Curva padrão de proteínas 49
3.5.2 Curva padrão de glicose 49
3.6 Determinação de proteínas totais 49
3.7 Atividade de enzimas celulases 50
3.7.1 Endoglucanase 50
3.7.2 Exoglucanase 50
3.8 Atividade de enzimas oxidorredutases 50
3.8.1 Lacase 51
3.8.2 Manganês peroxidase 51
3.8.3 Lignina peroxidase 51
3.9 Purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica 52
3.10 Análise do secretoma e da atividade enzimática por zimograma 52
3.11 Ensaio de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar 53
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
4.1 Atividade de oxidorredutases e seleção de cepas fúngicas 55
4.2 Identificação taxonômica e molecular 58

4.3 ***Produção e atividade de enzimas oxidorredutases e celulases***..... 64
4.4 ***Purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica***..... 70
4.5 ***Ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar***..... 73
V **CONCLUSÕES**..... 88
PERSPECTIVAS..... 90
REFERÊNCIAS..... 91
ANEXOS..... 105
APÊNDICES..... 106
APÊNDICE I - Preparo dos reagentes utilizados no estudo..... 106
APÊNDICE II - Curva padrão de proteínas e proteínas totais dos fungos *Pestalotiopsis* sp. e *Trichoderma reesei*..... 110
APÊNDICE III - Atividade enzimática de enzimas oxidorredutases do fungo *Pestalotiopsis* sp. durante cultivo em bagaço de cana-de-açúcar..... 112
APÊNDICE IV - Curva padrão de glicose e atividade enzimática de endoglucanases e exoglucanases durante cultivo em bagaço de cana-de-açúcar..... 127
APÊNDICE V - Atividade enzimática de oxidorredutases e celulases após purificação do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp. por cromatografia de troca iônica..... 133
APÊNDICE VI - Atividade específica de enzimas oxidorredutases e celulases do fungo *Pestalotiopsis* sp. e celulases do fungo *T. reesei* a serem utilizados na preparação do coquetel enzimático para o ensaio final de sacarificação do bagaço de cana de açúcar..... 142
APÊNDICE VII - Ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar..... 155

I Introdução

No Brasil, a cana de açúcar é uma importante cultura para obtenção de biocombustíveis, devido à que o bioetanol produzido a partir do caldo de cana-de-açúcar, constitui mais de 50% do combustível de transporte utilizado no país (FURTADO et al., 2009). O aumento na demanda por energia tem promovido consideráveis esforços para substituir combustíveis fósseis por biocombustíveis. Como segundo maior produtor mundial e exportador de etanol a partir da cana-de-açúcar, aproximadamente metade do suprimento de combustíveis do Brasil é produzido a partir de recursos renováveis (BORIN et al., 2015).

Atualmente, a cana-de-açúcar é considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol e aos respectivos subprodutos. Além da produção de etanol e açúcar, as unidades de produção têm buscado operar com maior eficiência, inclusive com geração de energia elétrica, auxiliando na redução dos custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade. A produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra 2017/18, é de 646,4 milhões de toneladas e a produção de etanol está estimada em 26,12 bilhões de litros. Até junho de 2017 foram produzidos 111,82 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar (CONAB, 2017), o qual pode ser utilizado na produção de bioetanol 2G, gerar energia elétrica e obter outros co-produtos economicamente importantes como farneseno e polietileno (DE SOUZA et al., 2013).

Para vencer a recalcitrância da biomassa lignocelulósica, é necessário um pré-tratamento para separar as porções celulósica e hemicelulósica da lignina, sendo desenvolvidas uma série de tecnologias como gaseificação da biomassa, fermentação/catálise e degradação enzimática (LOPES, 2015). A hidrólise enzimática é um passo essencial envolvido na bioconversão da lignocelulose para produzir monossacarídeos fermentáveis. A degradação da lignocelulose é iniciada principalmente por microrganismos como fungos que são capazes de degradar materiais lignocelulolíticos. Em fungos filamentosos, enzimas celulolíticas, incluindo endoglucanases, celobiohidrolases (exoglucanases) e β-glicosidases degradam celulose de forma sinérgica. Além das atividades celulolíticas / hemicelulolíticas, certas espécies de fungos possuem sistemas oxidativos únicos que, juntamente com as enzimas celulases

e hemicelulases são responsáveis pela degradação da lignocelulose (CAPOLUPO; FARACO, 2016; DASHTBAN et al., 2009). Assim, diferentes fungos filamentosos têm sido identificados e avaliados pela sua capacidade de secretar misturas de enzimas que aumentem a hidrólise da biomassa (OBENG et al., 2017).

Na presente dissertação são descritas as etapas de identificação do fungo *Pestalotiopsis sp.*, produtor de enzimas oxidorredutases, bem como ensaios de atividade enzimática, purificação das proteínas em estudo e avaliação das enzimas em estudo no processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar em complemento às enzimas celulolíticas produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*.

1 Revisão de literatura

1.1 Lignocelulose

A lignocelulose é a fonte mais abundante de matéria orgânica na biosfera, consistindo principalmente de três polímeros principais: celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de pectina, outras proteínas, sais minerais e cinzas. As proporções entre cada constituinte em uma determinada espécie de planta variam conforme a idade, estágio de crescimento e outras condições. A lignocelulose consiste na fonte mais abundante, renovável e de baixo custo de biomassa produzida a partir da fotossíntese, proporcionando um suprimento anual de 200 bilhões de toneladas métricas em todo o mundo (WAN; LI, 2012). A utilização mais eficiente da biomassa tem sido o objetivo de uma série de estudos, porque os açúcares obtidos a partir da lignocelulose podem ser transformados em combustível líquido (etanol, butanol), além de outros produtos químicos (PLACIDO; CAPAREDA, 2015).

No entanto, a transição de produtos à base de combustíveis fósseis para produtos a base de biomassa vegetal utilizando matérias-primas e tecnologias atuais são desafiadas pela resistência das paredes celulares da planta à desconstrução microbiana e enzimática, denominada recalcitrância. Embora outros fatores não possam ser negligenciados, a presença de lignina (cerca de 15-35% em peso) é um dos contribuintes de recalcitrância mais significativos, o que aumenta os custos de processamento (isto é, necessidade de pré-tratamento e maiores quantidades de enzimas). A lignina limita a hidrólise enzimática da biomassa através de dois mecanismos primários: restringindo o acesso das enzimas à

celulose e hemicelulose (formando uma barreira física) e inibindo a atividade enzimática (através de ligação não produtiva / não específica com enzimas) (LI et al., 2016). Assim, a biomassa lignocelulósica precisa de um pré-tratamento para produzir um substrato facilmente hidrolisado por enzimas celulolíticas comerciais, ou por microrganismos que degradam lignocelulose, liberando açúcares para fermentação (BAJPAI, 2016).

A celulose é o biopolímero mais abundantemente produzido pelos seres vivos, e organismos desde bactérias a plantas sintetizam celulose como um polímero extracelular para várias funções biológicas. A celulose é formada a partir de unidades repetidas de D-glicose, que estão ligadas através de ligações β (1 → 4) -glicosídicas. Este polissacarídeo natural tornou-se um dos biomateriais mais utilizados devido às suas propriedades estruturais, físicas e biocompatibilidade. Essas propriedades resultam das múltiplas interações de pontes de hidrogênio, resultando em um polímero semicristalino contendo regiões cristalinas altamente estruturadas, que formam materiais com alta resistência à tração (ISIK et al., 2014).

Cada molécula de glicose é rotacionada 180º em relação à molécula adjacente, resultando em uma estrutura linear, onde as longas e rígidas moléculas de celulose se combinam para formar microfibrilas, cada uma consistindo em centenas de moléculas de celulose. Na parede das células vegetais as microfibrilas de celulose estão imersas numa matriz contendo outros dois polissacarídeos complexos, as hemiceluloses e as pectinas. Além disso, sua estrutura contendo pontes de hidrogênio fazem da celulose uma estrutura insolúvel a muitos solventes e parcialmente responsável pela resistência à degradação microbiana. Como matéria prima é utilizada na indústria de papel, celulose alfa e outros derivados (JØRGENSEN, 2003).

As enzimas fúngicas envolvidas na degradação de polissacarídeos vegetais são atribuídas à pelo menos 35 famílias de glicosídeo hidrolases (GH), três famílias de esterases de carboidratos (CE) e seis famílias de polissacarídeo-liases (PL). A degradação da celulose requer principalmente três classes de enzimas, β-1,4-endoglucanases (EGL), exoglucanases / celobiohidrolases (CBH) e β-glicosidases (BGL), que são divididas em oito famílias de GH. Por exemplo, *Aspergillus niger* tem cinco EGLs dentro das famílias de GH 5 e 12, quatro CBHs nas famílias 6 e 7 e 13 BGLs nas famílias 1 e 3. Em comparação, um dos fungos de degradação de celulose mais eficientes *Trichoderma*

reesei tem cinco EGLs caracterizados nas famílias de GH 5, 7, 12 e 45, duas CBH altamente expressas nas famílias 6 e 7, e duas BGLs caracterizadas nas famílias 1 e 3. Embora *T. reesei* não tenha o maior número de celulases, seu conjunto de enzimas é muito eficiente na quebra de celulose, atuando de forma sinérgica, sendo as enzimas deste microrganismo as mais utilizadas na indústria do bioetanol. (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

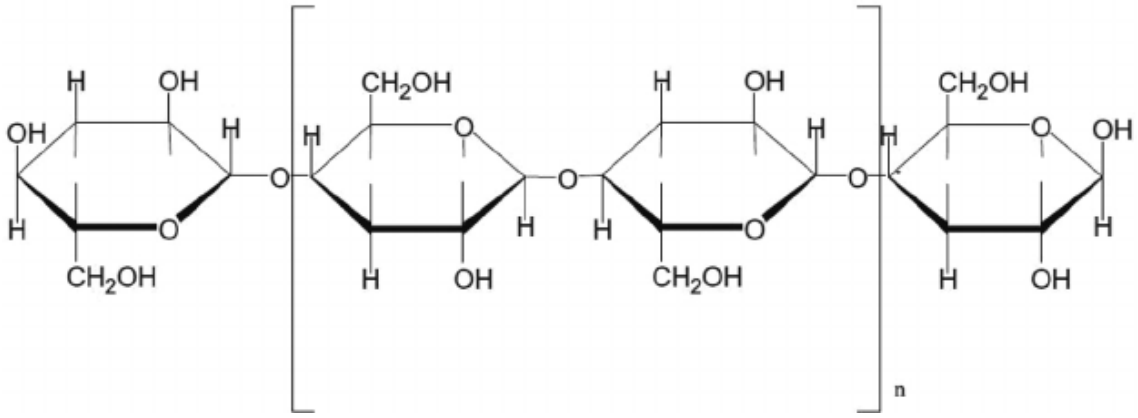


Figura 1 - Representação da estrutura química da celulose (TAKUR et al., 2014).

Em contraste com a celulose, que é um homopolímero de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas, a hemicelulose apresenta uma ampla gama de polímeros heterogêneos contendo uma espinha dorsal de xilose, arabinose, galactose ou monômeros de manose. As hemiceluloses mais comuns são os xilanos, que têm uma espinha dorsal de monômeros de xilose unidos através de ligações β (1 → 4) e cadeias laterais de arabinose, ácido glucurônico ou seu derivado 4-O-metila e grupos laterais de acetila. A estrutura da hemicelulose, seus monômeros de espinha dorsal, seu grau de ramificação e o tipo de cadeias laterais variam amplamente entre diferentes espécies de plantas e até mesmo tecidos dentro da mesma planta. Por exemplo, os xiloglucanos dominam as paredes celulares primárias das plantas dicotiledôneas, enquanto os glucuronoarabinoxilanos são prevalentes tanto nas paredes celulares primárias como secundárias de algumas espécies de plantas monocotiledôneas (por exemplo, cana-de-açúcar e milho) (DE MAAYER et al., 2014). Tipicamente, hemiceluloses em coníferas são compostas majoritariamente de glucomananos, enquanto hemiceluloses em

angiospermas são compostas principalmente de xilanos, juntamente com porcentagens variáveis de galactose, arabinose, ramnose e unidades de ácido metilglucurônico e grupos acetil (DASHTBAN et al., 2010; MARTINEZ et al., 2005).

A degradação da hemicelulose por fungos filamentosos requer a produção de muitas enzimas diferentes, que são induzidas por biopolímeros ou seus derivados e reguladas principalmente no nível transcricional (SUN et al., 2012). Os três componentes principais das hemiceluloses são hidrolisados por um conjunto específico de enzimas dedicadas a carboidratos: β-1,4-endoxilanase e β-1,4-xilosidase para xilano, β-1,4-endoglucanase e β-1,4-glicosidase para xiloglicano e β-1,4-endomannanase e β-1,4-manosidase para (galacto-) manano (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Além disso, o xilano pode ser associado à lignina por ésteres aromáticos. Assim, para despolimerizar o xilano de forma eficiente para os seus monossacarídeos constituintes, um organismo eficiente na degradação de xilano deve possuir um conjunto de enzimas especializadas. Estas enzimas incluem β-1,4-endoxilanase (EC 3.2.1.8), β-D-xilosidases (EC 3.2.1.37), α-l-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α-glucuronidases (EC 3.2. 1.139), acetil-xilano esterases (EC 3.1.1.72) e esterases de ácido ferulico / cumárico (EC 3.1.1.73) (MOON et al., 2011).

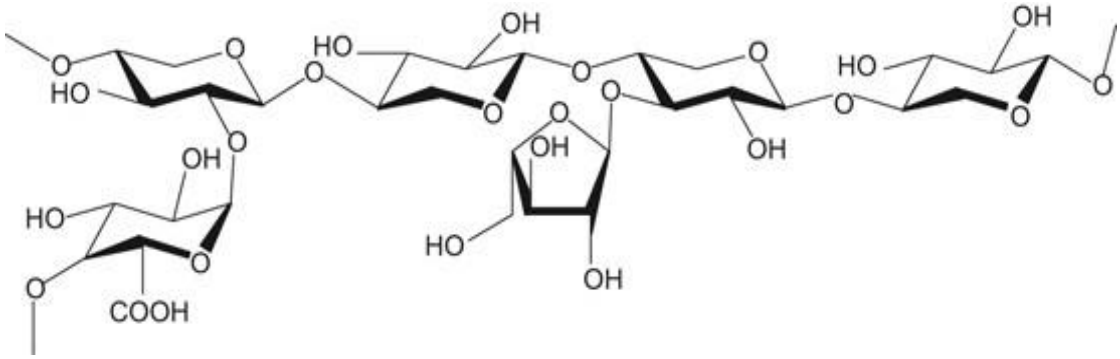


Figura 2 - Representação da estrutura química da hemicelulose (ZVIELY, 2013).

A lignina é uma macromolécula amorfa encontrada nas plantas associada a celulose na parede celular vegetal com a função de conferir rigidez e resistência a fatores mecânicos (vento, chuva) e ataques de microrganismos, aos tecidos vegetais. Uma das principais funções da lignina é apontada pela sua deposição em resposta a vários tipos de injúrias e ataques por fungos. A lignina de cicatrização protege a planta de ataques por fungos ao aumentar a resistência das paredes à penetração mecânica, protegendo-as também contra a atividade das enzimas do fungo para dentro da planta (RAVEN et al., 2005). Em comparação com outros polímeros da parede celular, tais como pectinas e hemiceluloses, que são sintetizados no citoplasma e exportados para a parede celular, a formação do polímero de lignina ocorre diretamente na parede celular pela polimerização oxidativa de monômeros de lignina segregados (BARROS et al., 2015).

A lignina em sua forma nativa constitui a maior fonte de moléculas aromáticas na biosfera, sendo considerada uma promissora fonte de energia renovável (BERLIN; BALAKSHIN, 2014) e tendo um papel fundamental no ciclo do carbono (TIEN; KIRK, 1983). Apenas superada pela celulose como o mais abundante composto orgânico na biosfera, a lignina é formada pela polimerização dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. A proporção destes três compostos resulta em diferentes tipos de lignina. Por exemplo, a lignina da madeira de coníferas é formada pelos monômeros derivados dos álcoois coniferílico (guaiacil) e cumarílico (hidroxifenil), enquanto na madeira de plantas folhosas é formada pelos monômeros derivados dos álcoois sinapílico (siringil) e coniferílico (guaiacil). Já a lignina das gramíneas é composta pelos monômeros derivados dos três tipos de álcoois precursores (DEL RIO et al., 2005).

A conversão de lignina em diversos produtos de valor agregado desempenha um papel importante na viabilidade econômica das biorrefinarias. As metodologias de conversão de lignina podem ser divididas em três grupos: (1) hidrotermal, (2) químico e (3) enzimático. O tratamento hidrotermal foi relatado como uma excelente técnica de conversão de lignina, onde até 50% da lignina total pode ser removida da biomassa. No entanto, devido à alta temperatura e pressão, a reação de condensação entre os fragmentos de lignina altamente reativos acelera a geração de produtos tóxicos. O tratamento químico utiliza agentes específicos para cozinhar o material sob pressão, podendo ser basicamente ácidos (sulfitos) ou alcalinos (sulfato e soda). Apesar de sua eficiência tem como desvantagem a formação de resíduos altamente tóxicos, sendo responsáveis por grande

parte dos resíduos gerados pelas indústrias de papel e celulose. Por outro lado, muitas aplicações utilizando microrganismos que degradam lignina e suas enzimas tem se tornado atrativas, gerando tecnologias ambientalmente favoráveis para as indústrias de papel e polpa de madeira, e para o tratamento de muitos compostos xenobióticos, corantes e resíduos industriais. O principal grupo de enzimas lignolíticas inclui lignina peroxidase, manganês peroxidase, peroxidases versáteis e lacases. Devido às estruturas específicas, diferentes enzimas lignolíticas possuem diferentes mecanismos de degradação / oxidação de lignina e produzem diferentes compostos (HATAKKA, 2015; TANG et al., 2015).

Independente do uso da biomassa, é necessário um pré-tratamento para separar as três frações lignocelulósicas, em particular a lignina, que é considerada a barreira física, que determina a recalcitrância e dificulta o uso da biomassa em diversos processos.

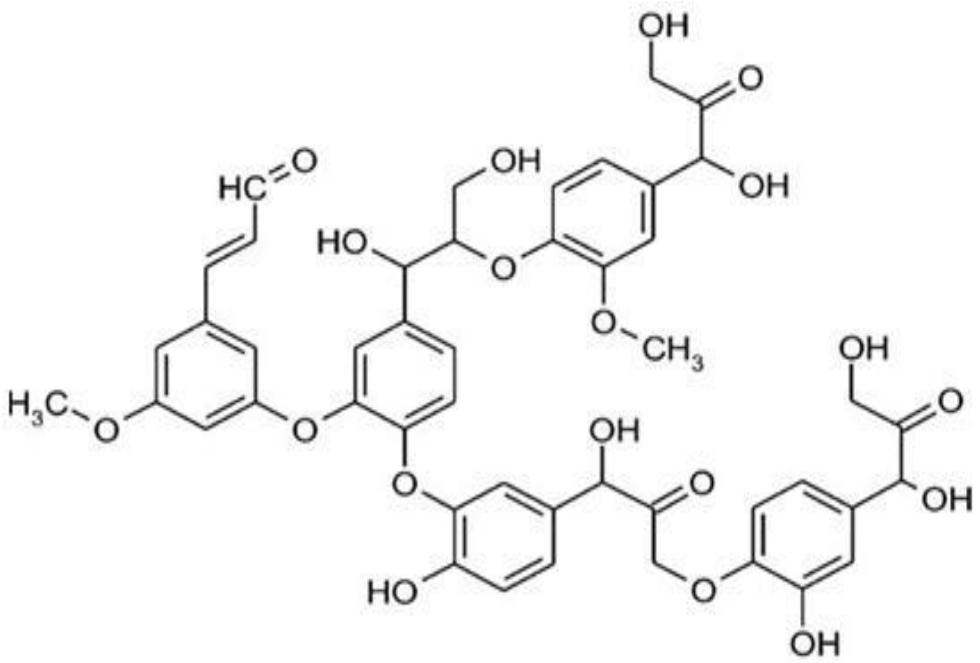


Figura 3 - Representação da estrutura química da lignina (SOYGUN et al., 2013).

1.2 Degradação da lignocelulose e processos biotecnológicos

Várias classificações aplicam-se à biomassa lignocelulósica, incluindo biomassa residual, biomassa virgem e culturas energéticas. A biomassa residual é tida como subproduto de baixo valor, em grande parte gerado por atividades florestais industrializadas (serradura, resíduos de madeira, resíduos de polpas), práticas agrícolas (farinha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e cascas de arroz) e resíduos sólidos urbanos (de jardinagem e poda de arvores). O aumento da geração de resíduos lignocelulósicos dos setores industrial e agrícola representa um desafio ambiental devido, em parte, a uma má gestão do uso e descarte desses resíduos. Porém, a perspectiva de valorização dos resíduos lignocelulósicos para obtenção de produtos de maior valor agregado deve ser uma estratégia efetiva de gerenciamento destes resíduos (FALADE et al., 2016).

Nos últimos anos, a viabilidade socioeconômica e ambiental dos biocombustíveis de primeira geração tem sido alvo de discussões. Desde 2000, o preço dos alimentos tem aumentado em escala global, sendo os países em desenvolvimento os principais afetados. Entre os motivos está o aumento no número de culturas destinadas a produção de biocombustíveis em relação as culturas destinadas a produção de alimentos (CASON et al., 2014). Segundo Mohr e Raman (2013), uma alternativa seria investimentos em tecnologias relacionadas à biocombustíveis de segunda geração, uma vez que as maiores fontes de biocombustíveis 2G são resíduos provenientes da agricultura (palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar), resíduos florestais e resíduos de plantas lenhosas e herbáceas provenientes da indústria, não competindo com a produção de alimentos.

Em geral a produção de bioetanol de segunda geração através do material de lignocelulose inclui três etapas: Pré-tratamento, sacarificação e fermentação. O processo de pré-tratamento modifica a estrutura da lignocelulose removendo a lignina e alterando a estrutura da celulose e da hemicelulose. A sacarificação é a transformação enzimática de celulose e hemicelulose em monossacarídeos como glicose e xilose, enquanto que a fermentação é a transformação desses monossacarídeos em etanol. As metodologias de pré-tratamento atuais utilizam processos intensivos em energia (altas pressões e temperaturas) e compostos químicos agressivos (PLACIDO; CAPAREDA, 2015). Por exemplo, o pré-tratamento químico da biomassa, com ácidos ou solventes orgânicos,

antes da digestão enzimática, pode gerar subprodutos derivados da lignocelulose, como compostos fenólicos que inibem os biocatalisadores enzimáticos (DAVIDI et al., 2016). Assim a combinação gera compostos indesejáveis e ineficiências no processo. Para superar essas limitações, devem ser exploradas tecnologias sustentáveis. Diversos processos que combinam ou não essas etapas tem sido desenvolvidos para obtenção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, entre eles: co-fermentação (CF), sacarificação simultânea e fermentação (SSF), sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF) e bioprocesso consolidado (CBP) (CARDONA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2005; WYMAN, 2007).

O maior desafio para a conversão biológica da biomassa vegetal está na recalcitrância da lignocelulose. As porções celulósica e hemicelulósica da biomassa podem ser separadas da lignina e despolimerizadas para obter açúcares fermentáveis, como glicose, xilose e arabinose (LOPES, 2015). Estudos para determinar a degradação e modificação do polímero de lignina têm identificado à participação de enzimas oxidoredutases como: lacases, peroxidases (lignina peroxidase, manganês peroxidase e versátil peroxidase) (LEE, 1997; MARTÍNEZ et al., 2005; SÁNCHEZ, 2009; SARITHA et al., 2012), e na degradação da celulose participam principalmente as enzimas: exoglucanases (EC 3.2.1.74), endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β-glicosidases (EC 3.2.1.21), além de enzimas que degradam hemicelulose como β-1,4-endoxilanase (EC 3.2.1.8), β-D-xilosidases (EC 3.2.1.37), α-l-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α-glucuronidases (EC 3.2. 1.139), acetil-xilano esterases (EC 3.1.1.72) e esterases de ácido ferulico / cumárico (EC 3.1.1.73) (GOMEZ DEL PUGAR; SAADEDIN, 2014; RIZK et al., 2012).

Com base nessas pesquisas foram estabelecidos dois sistemas de degradação da lignocelulose: (i) o sistema celulolítico, constituído por enzimas hidrolíticas que degradam os carboidratos, e (ii) o sistema acessório, constituído por enzimas auxiliares e/ou acessórias como o sistema de enzimas oxidorredutases lignolítico responsável pela despolimerização da lignina, cujas enzimas geram radicais livres altamente reativos e não específicos que clivam os enlaces interunidades carbono-carbono e éter, e as enzimas polissacarídeo monooxigenases (PMO) que clivam enlaces glicosídicos nas moléculas de celulose utilizando oxigênio molecular (LEVASSEUR et al., 2013).

O bagaço da cana-de-açúcar por exemplo é composto de 38% - 43% celulose, 25% - 32% hemicelulose e 17% - 24% lignina (DE SOUZA et al., 2013; SZCZERBOWSKI et al., 2014). Sendo assim, para a eficiente separação das frações lignocelulósicas poderia ser utilizado um coquetel enzimático composto pelas enzimas: celulases, β-glicosidases, endo-xilanases, arabinofuranosidades, feruloil-esterases, β-xilosidases, lichenases, xiloglucanases, endoglucanases, β-galactosidases, α-xilosidases, endopoligalacturonases, pectin metil esterases, arabinosidases, galactanases, arabinanases, lacases e peroxidases, ao qual podem ser adicionadas as enzimas polissacarídeo monooxigenases (PMO) (LEVASSEUR et al., 2013).

1.3 Enzimas oxidorredutases

Para degradar a lignocelulose, os fungos secretam ativamente diferentes enzimas oxidativas e hidrolíticas juntamente com compostos de baixa massa molecular (HATAKKA; HAMMEL, 2010). Assim, fungos basidiomicetos são conhecidos por secretar enzimas peroxidases ligninolíticas, que pertencem à classe II das heme-peroxidases microbianas. Entre eles estão as enzimas manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e peroxidase versátil (VP) (HOFRICHTER et al., 2010). Fenoloxidases (lacases) são outro grupo extracelular de oxidorredutases que, em contraste com peroxidases lignolíticas, são frequentemente encontradas em fungos ascomicetos e basidiomicetos colonizando madeira e lixo. (LIERS et al., 2010).

Enzimas oxidorredutases catalisam a transferência de elétrons desde uma molécula doadora de elétrons (redutor) a outra, aceptora de elétrons (oxidante). Enzimas oxidases são uma subclasse de enzimas oxidorredutases que catalisam reações de oxido-redução, utilizando oxigênio molecular (O_2) como aceptor de elétrons. Em reações com participação de átomos de hidrogênio, o oxigênio é reduzido à água (H_2O) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAY; PADGETTE, 1983).

Lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase são assumidas como sendo a primeira linha de proteínas expressas em fungos durante a degradação da lignina (JANUSZ et al., 2012). Devido à estrutura complexa da lignina e suas subunidades fenólicas, enzimas envolvidas em sua degradação exibem ampla especificidade pelo substrato. Além disso, para uma eficiente degradação, oxidases e peroxidases são preferidas a hidrolases devido à alta ocorrência de pontes carbono-carbono. (LEE, 1997;

MARTÍNEZ et al., 2005; POLLEGIONI et al., 2015; SÁNCHEZ, 2009; SARITHA et al., 2012).

A capacidade de LiP, MnP e lacase para degradar a lignina foi estudada na compostagem de resíduos agrícolas e em diversos processos industriais, incluindo a deslignificação da polpa e a biorremediação de solos e água, mas essa habilidade não é idêntica entre esses três tipos de enzimas. Isso pode ser devido a que as interações enzima-substrato são diferentes (MARTINEZ et al., 2005). O estudo dos mecanismos interativos envolvidos em enzimas e lignina é realmente importante na compreensão das reações enzimáticas e contribuindo para a melhoria das tecnologias de polimerização e branqueamento (CHEN et al., 2011).

Além disso, enzimas que degradam lignina são estudadas devido a sua potencial aplicação biotecnológica em vários outros setores industriais. As aplicações incluem: i) biotransformação de biomassa lignocelulósica em combustíveis e produtos químicos; ii) biopolpação; iii) biobranqueamento de polpa de papel; iv) descoloração e desintoxicação de efluentes do processo Kraft; v) degradação de compostos químicos ambientais altamente tóxicos; vi) biossensor; vii) cosméticos; viii) alimentos e outros. Estas enzimas estão envolvidas na degradação de lignina, de vários compostos xenobióticos tais como hidrocarbonetos aromaticos policiclicos (HAPs) e compostos químicos corantes ou efluentes industriais que podem representar um risco potencial para a saúde e o meio ambiente (CHEN et al., 2011).

1.3.1 Lacase (EC: 1.10.3.2)

Multicobre oxidases (MCOs) formam uma família de enzimas que são largamente distribuídas na natureza, incluindo lacases, ascorbato oxidases, bilirubina oxidases e ferroxidases (RAMOS et al., 2011). Esse grupo cataliza a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo mono-, di-, e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas através da redução de quatro elétrons de oxigênio molecular em água (LELE; MADHAVI, 2009).

As lacases possuem papel vital no ciclo de vida dos fungos, estando envolvidas na síntese de melanina e outros pigmentos, formação de corpos de frutificação, formação de conídios, esporulação e patogênese em plantas. Estudos recentes mostram que a lacase e

os genes que codificam MCOs são bastante numerosos em basidiomicetos, bem como em ascomicetos tais como *Aspergillus niger* (RAMOS et al., 2011), *Trichoderma* spp. (CÁZARES-GARCÍA et al., 2013) e *Fusarium oxysporum* (KWIATOS et al., 2015), que são capazes de decompor e converter a lignocelulose vegetal. Ao contrário, reconhecem-se vários genes de lacase nos basidiomicetos não degradantes de lignina *Coprinopsis cinerea* e *Laccaria bicolor*, com funções e perfis de expressão desconhecidos (LUNDELL et al., 2010).

Para produtos industriais e biotecnológicos, as lacases foram as primeiras oxidoredutases fúngicas estudadas, fornecendo aplicativos de maior escala, como remoção de polifenóis em vinho e bebidas, conversão de compostos tóxicos e corantes têxteis em águas residuais, e no branqueamento e remoção de lignina da madeira. Além de fungos, tipos similares de MCOs existem em plantas, insetos e bactérias mostrando a ampla distribuição dos representantes das enzimas MCO na natureza (SAKURAI; TAKAOKA, 2007).

Lacase tem potencial redox mais baixo que outras enzimas lignolíticas, como manganês peroxidase e lignina peroxidase e por isso oxida somente fragmentos fenólicos de lignina. O emprego de mediadores apropriados pode aumentar consideravelmente o espectro de substratos oxidados pela lacase, possibilitando a oxidação de compostos não fenólicos. Foi demonstrado que a remoção de determinados compostos xenobióticos foi reforçada pela adição de um mediador que é comparativamente mais reativo em relação ao catalisador selecionado do que o próprio substrato alvo. Por exemplo, estudos envolvendo a degradação de xenobióticos por lacase demonstraram que a presença de matéria orgânica natural no meio gerou as reações de bifenilos policlorados e hidrocarbonetos poliaromáticos que, sem uma solução fenólica ou anilínica, não podem servir como doadores ativos para a enzima. Em particular, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) foi capaz de expandir a especificidade pelo substrato da lacase como um mediador redox. Após a inclusão de ABTS, a gama de substratos de lacase pode ser estendida a subunidades não fenólicas de lignina que não podem ser transformadas por lacase sozinha (DONG et al., 2016). Além disso, o uso de ABTS também aumentou significativamente a remoção de disruptores endócrinos como o bisfenol A (de <20% para 100%) e nonilfenol (de 65% para 100%) no mesmo período de incubação (CABANA et al., 2007). Estudos feitos por Dong et al., (2016) indicam que

labetalol, um contaminante proveniente de resíduos de medicamentos na água pode ser efetivamente transformado por uma reação catalisada por lacase usando ABTS como mediador, onde não foi demonstrada remoção significativa de labetalol na ausência de ABTS (CABANA et al., 2007).

Devido a sua habilidade de catalisar reações produzindo apenas água como único subproduto, tem aumentado o interesse da indústria em seu uso como catalisador de "reações verdes", sendo aplicada em uma variedade de processos, como quebra de biomassa vegetal, branqueamento de corantes têxteis, bioremediação da água e do solo, formação de pigmentos, desenvolvimento de testes clínicos e aplicações nos campos dos biosensores, bioreatores e células de biocombustíveis (RAMOS et al., 2011).

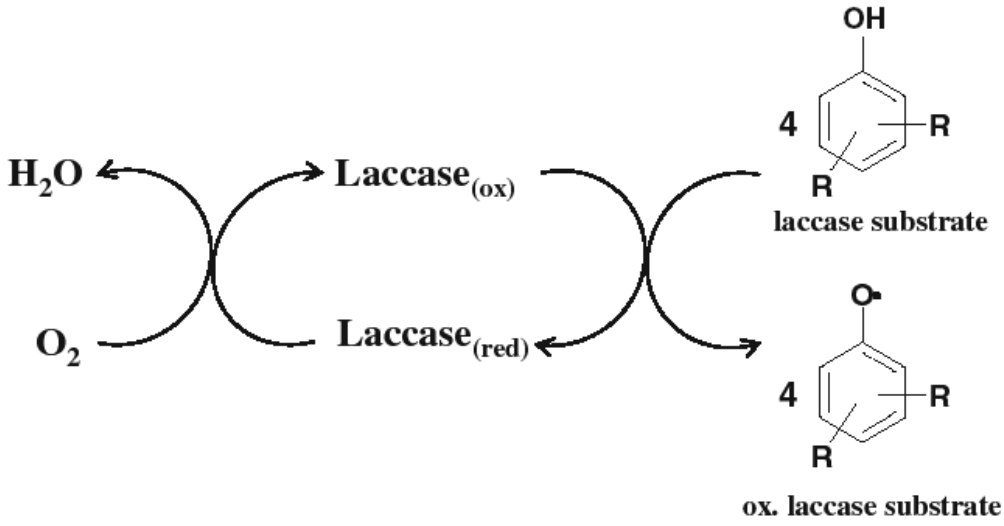


Figura 4 - Ciclo catalítico de reação mediada pela enzima lacase (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

1.3.2 Manganês peroxidase (EC: 1.11.1.13)

Manganês peroxidase (MnP) é uma heme-glicoproteína produzida somente por fungos basidiomicetos durante o metabolismo secundário e alguns fungos da podridão branca (PATRICK et al., 2011). Sua secreção ocorre em múltiplas isoenzimas codificadas em uma família de genes altamente relacionados, tendo sido descritos mais de 11 diferentes isoformas em *Ceriporiopsis subvermispora* (JANUSZ, 2013).

A MnP foi descoberta por Kuwahara et al., (1984) e foi descrito como a peroxidase modificadora de lignina mais comum secretada pela maioria fungos de podridão branca e decompositores de lixo. Seu envolvimento na degradação de lignina tem sido relatado e bem estudado em fungos (HOFRICHTER, 2002). O mecanismo de ação do MnP inclui a oxidação de Mn^{2+} para Mn^{3+}, que é altamente reativo e, por sua vez, oxida uma ampla gama de substratos fenólicos incluindo fragmentos fenólicos da lignina. Não obstante, MnP também possui a capacidade de oxidar estruturas não fenólicas com a aplicação de mediadores, incluindo radicais lipídicos. Além disso, a capacidade de MnP de oxidar e despolimerizar lignina natural e sintética e compostos recalcitrantes também foi relatada. (FALADE et al., 2016)

O ciclo catalítico de MnP inicia-se com sua oxidação por H_2O_2 ou peróxidos orgânicos, que levam a enzima à um estado de oxidação deficiente em dois elétrons denominado MnP composto I. MnP composto I é então reduzido a MnP composto II por um Mn^{2+} monoquelado, que é oxidado a Mn^{3+}. A enzima nativa é então regenerada a partir da redução adicional de MnP Composto II por Mn^{2+} e liberação de uma molécula de água, resultando na formação Mn^{3+}, sendo um forte oxidante (SCHIMIDT, 2006).

Desde a sua descoberta, o interesse em seu uso tem aumentado devido a sua potencial aplicação em bioremediação, além de seu papel essencial na despolimerização da lignina e cloro-lignina, bem como no branqueamento da celulose. Recentemente tem sido mostrado que MnP na presença de ácidos orgânicos é capaz de mineralizar a lignina e compostos modelo em grande quantidade (HATAKKA, 2015).

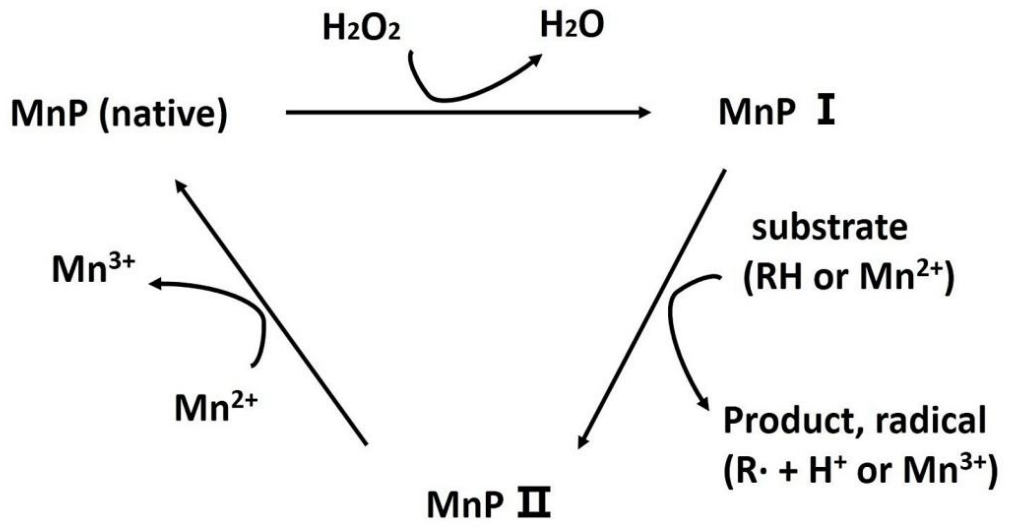


Figura 5 - Representação do ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase (QIN et al., 2014).

1.3.3 Lignina peroxidase (EC: 1.11.1.14)

Lignina peroxidase é uma heme-glicoproteína e possui um papel central na biodegradação da parede celular da lignina. LiP catalisa a oxidação de estruturas fenólicas e não fenólicas, além de uma vasta gama de compostos modelo (por exemplo, guaiacol, álcool vanilílico, catecol, ácido siérico e actosiringona) (DASHTBAN, 2010). A sua presença foi descrita pela primeira vez no basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* e tem sido a peroxidase mais estudada desde então. Sua atividade é geralmente dependente de H_2O_2 e têm potencial redox muito alto e pH ótimo baixo. Ambas estas características são importantes para a sua capacidade de oxidar uma variedade de substratos, incluindo substratos poliméricos tais como compostos corantes complexos. LiPs têm um ciclo enzimático típico, característico de outras peroxidases. LiP, MnP e versátil peroxidase compartilham características semelhantes, o que é responsável, entre outros fatores pelo seu alto potencial redox. No entanto, eles diferem nos substratos que eles podem oxidar devido à presença de diferentes sítios catalíticos em suas estruturas moleculares (OGOLA et al., 2015).

LiP oxida diferentes compostos modelo de lignina não fenólica, incluindo Ácidos de arilglicerol-arilo de tipo β-O-4. As propriedades oxidativas de LiP envolvem a

formação de radicais catiônicos através da oxidação de 1 elétron, levando a clivagem de cadeia lateral, desmetilação, adição intramolecular e rearranjos. Hidroxilação de grupos metileno benzílico, oxidação de álcoois benzílicos aldeídos ou cetonas correspondentes e oxidação de fenol são outros processos oxidativos associados a LiP. Além da oxidação de substratos não fenólicos, possui a capacidade adicional de oxidar uma variedade de compostos fenólicos como como anilinas, guaiacol, A-acetossiringona, catecol, álcool vanílico e ácido siringídico. Nesta conjuntura, o álcool veratílico, um metabolito não fenólico de alto potencial redox foi sugerido como um mediador redox, sendo relatado para melhorar a atividade de lignina peroxidase na degradação de lignina. O ciclo catalítico da lignina peroxidase envolve três etapas: O primeiro passo de reação é a oxidação da enzima férrica em repouso [Fe (III)] por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um aceitador de elétrons resultante na formação do intermediário oxo-ferril composto I. No segundo passo, o intermediário oxo-ferryl (deficiente em 2^{e-}) é reduzido por uma molécula de substrato, tal como substrato aromático não fenólico (S) que doa um elétron (1^{e-}) para formar o segundo intermediário, denominado composto II (deficiente de 1^{e-}) enquanto o último passo envolve a subseqüente doação de um segundo elétron ao composto II pelo substrato reduzido, devolvendo o LiP para o férrico oxidado, que indica a conclusão do ciclo de oxidação (FALADE et al., 2016).

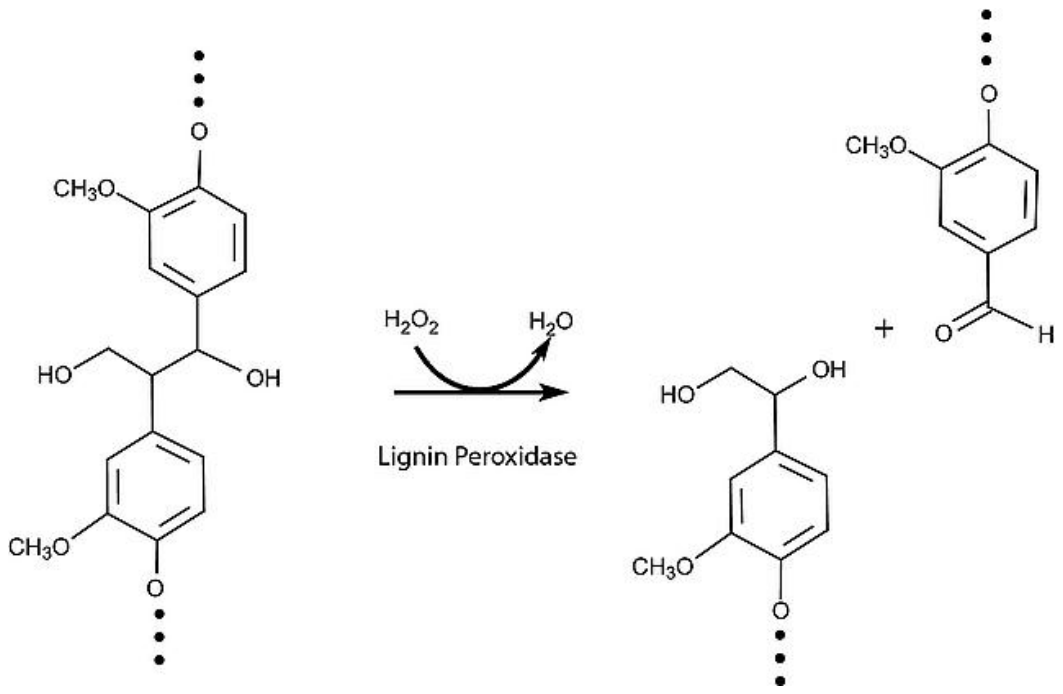


Figura 6 - Representação do mecanismo de ação da enzima lignina peroxidase (FRANSSEN et al., 2013).

1.4 Fungos filamentosos e enzimas com aplicação em biotecnologia

Fungos filamentosos incluem grupos de seres eucariotos como algumas leveduras, basidiomicetos e principalmente fungos ascomicetos. A principal característica do grupo é a de apresentar estruturas ramificadas denominadas hifas que em conjunto constituem o micélio. Os fungos filamentosos constituem a maioria dos gêneros de fungos atualmente descritos incluindo importantes organismos pertencentes aos gêneros *Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Cladosporium, Emericella, Eurotium, Trichoderma, Curvularia*, entre outros (EGBUTA et al., 2016).

Além de exercerem importantes funções vitais em seus ecossistemas naturais, como recirculação da biomassa os fungos filamentosos representam recursos genéticos para aplicação em muitos processos e produtos biotecnológicos (NODVIG, 2015). As enzimas fúngicas são usadas em processos de fabricação em larga escala, incluindo produção de papel e celulose, alimentos, bebidas, vinho, detergentes, industria têxtil e biocombustíveis, sendo a maioria das enzimas utilizadas em todo o mundo produzidas por fungos filamentosos. Em 2016, o mercado global de enzimas industriais foi estimado em 4 bilhões de euros (NOVOZYMES, 2016). A diversidade metabólica dos fungos e a ampla gama de nichos ecológicos em que habitam significam que muitas espécies têm potencial significativo como fontes de novas enzimas para exploração (MEYER et al., 2016).

De maneira geral os microrganismos têm a capacidade de utilizar vários substratos como consequência da diversidade de sua evolução biológica e bioquímica. Os substratos sólidos que utilizam incluem, entre outros, plantas vivas. Tanto as bactérias quanto os fungos são conhecidos por cooperar com muitas plantas para formar associações mutuamente benéficas, vivendo como organismos endófitos. Nos últimos anos, acumulou-se um conhecimento considerável sobre a biologia dos endófitos, os quais constituem uma parcela grande, mas pouco explorada, da diversidade de fungos, onde se estima a existência de aproximadamente 1 milhão de espécies (SHARMA et al., 2016). Diversas espécies de fungos filamentosos endófitos como *Colletotrichum* sp., *Macrophomina phaseolina, Nigrospora sphaerica, Fusarium solani* (AYOB;

SIMARANI, 2016), foram isolados nos últimos anos, representando uma importante fonte de novos microrganismos.

Os fungos endófitos são de interesse biotecnológico devido ao seu potencial como fonte de metabolitos secundários que foram provados úteis para a descoberta de novos medicamentos, tendo demonstrado a produção de vários compostos farmacológicamente importantes como anticancerígenos (cajanol), anti-inflamatórios (ergoflavina) e antioxidantes (lectina) (SHARMA et al., 2016). Além disso, diversos fungos filamentosos endófitos como *Cochliobolus australiensis, C. lunatus, Gibberella baccata, Aspergillus niger, A. ochraceus* e *Nodulisporium* sp. mostraram-se produtores de celulases, xilanases, lipases (BEZERRA et al., 2015) e lacases (RAMOS et al., 2011), representando uma importante fonte para a obtenção de enzimas lignocelulolíticas.

Os fungos filamentosos também apresentam metabolismo secundário, produzindo compostos como micotoxinas, que prejudicam, ou mesmo matam animais e humanos. Por exemplo, espécies do gênero *Aspergillus* produzem aflatoxinas carcinogênicas e os custos devido ao controle de micotoxinas em produtos agrícolas equivalem a vários bilhões de dólares por ano; outros metabolitos secundários incluem compostos medicamente relevantes, como antibióticos (penicilina), imunosupressores (ácido micofenólico) (NODVIG, 2009), além de alcalóides, giberelinas, imunomoduladores, pigmentos e vitaminas (ADAV et al., 2012; DA SILVA et al., 2012; DELABONA et al., 2013; MANAVALAN et al., 2012; MARX et al., 2013; RIBEIRO et al., 2012). Assim, as coleções de culturas fúngicas constituem patrimônio genético de grande valor atualmente, no qual o desenvolvimento econômico e social sustenta-se, em grande parte, na biotecnologia. (DE MELLO, 2011).

A principal estratégia de bioprospecção adotada pelas empresas multinacionais consiste na busca desses microrganismos provenientes da maior diversidade de ambientes possível, obtendo amostras do solo, isolados de fungos e microorganismos associados a plantas e insetos, principalmente em regiões tropicais pouco exploradas (DE MELLO, 2011). Além do Brasil, diversos países do mundo vêm desenvolvendo estudos na área de prospecção de fungos e engenharia de enzimas. Os Estados Unidos iniciaram a execução do projeto *1000 Fungal Genome,* que agrega diversas instituições norte-americanas em torno do sequenciamento do DNA de 1000 espécies de fungos até 2016, justamente em

função desses microrganismos serem de grande importância econômica e potencial aplicação biotecnológica (GRIGORIEV et al., 2014). O genoma de vários fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas já foi sequenciado nos últimos dez anos, permitindo estudos sistemáticos de seus sistemas enzimáticos. Com base no aumento de informações genômicas e proteômicas, novas enzimas foram identificadas (LIU et al., 2013).

Fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas incluem espécies do filo ascomycota (*Trichoderma reesei*) e basidiomicetos como fungos da podridão branca (*Phanerochaete chrysosporium*) e fungos da podridão marron (*Formitopsis palustris*). Além disso, algumas espécies anaeróbicas (*Orpnomyces* sp.) são capazes de degradar celulose no trato gastrointestinal de ruminantes. A degradação da biomassa por esses fungos é realizada por uma mistura complexa de celulases, hemicelulases e ligninases, Até 1976, por volta de 14.000 espécies de fungos capazes de degradar lignocelulose já haviam sido isolados, mas poucas foram estudadas em profundidade (DASHTBAN, 2009).

A degradação da lignina é atribuída majoritariamente a espécies de fungos do filo *Basidiomycota*, sendo fenotipicamente divididos em três grupos: fungos da podridão branca, fungos da podridão marrom e fungos da podridão branda, que se diferenciam quanto a forma como degradam os diferentes componentes da lignocelulose, com fungos filamentosos do filo Ascomycota sendo estudados apenas recentemente (HATAKA, 2015; JANUSZ, 2013). Ascomicetos em sua maioria são capazes de degradar celulose e hemicelulose, mas sua habilidade em degradar lignina tem sido pouco estudada. Fungos que degradam lignina de forma seletiva apresentam potenciais aplicações biotecnológicas, onde a remoção da lignina é necessária para a obtenção de celulose intacta e sua posterior utilização na indústria de papel, ração animal e biocombustíveis (DASHTBAN, 2010).

Porém, estudos recentes relatam a presença de genes de lacase em fungos filamentosos ascomicetos como *Phoma* sp. (JUNGHANS et al., 2009), *Fusarium oxysporum* (CANERO et al., 2008), *Aspergillus niger* (RAMOS et al., 2011) e *Aspergillus nidulans* (SCHERER, 2001). Um estudo feito por Bonugli-Santos et al., (2015) relatou diferentes espécies de fungos filamentosos provenientes de ambientes

marinhos capazes de degradar corantes sintéticos e efluentes têxteis, além da degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Diferentes cepas marinhas identificadas como *Penicillium citrinum* CBMAI 853, *Aspergillus sulphureus* CBMAI849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI857 e *Trichoderma* sp. CBMAI852 foram capazes de degradar o corante têxtil RBBR, enquanto *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI849 foi capaz de degradar pireno e benzopireno, podendo estar relacionado a produção de enzimas oxidorredutases lignolíticas, além da ação do sistema citocromo P-450 monoxigenase. Além disso, um estudo feito por Govarthanan et al., (2017) relatou a produção de manganês peroxidase em *Penicillium* sp. CHY-2 e a degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos.

O sistema de enzimas lignocelulolítico de fungos filamentosos é de importância fundamental para a eficiente conversão da biomassa vegetal, além de serem utilizadas em muitas indústrias, como cosméticos, bioquímica analítica e indústria têxtil. Para a aplicação dessas enzimas em tecnologias industriais e ambientais são necessárias grandes quantidades de enzimas a um baixo custo. Assim, é de vital importância a identificação de diferentes microrganismos e o desenvolvimento de novas estratégias para uma produção mais eficiente (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009).

1.4.1 Pestalotipsis sp.

O gênero *Pestalotiopsis* (Xylariales, Ascomycota) inclui espécies amplamente distribuídas, ocorrendo em uma ampla gama de substratos, em plantas vivas como patógenos ou endófitos e em materiais vegetais mortos como saprófitos. No entanto, diversas espécies de *Pestalotiopsis* spp. foram amplamente isoladas de tecidos vegetais saudáveis e considerados principalmente como endófitos na última década. As investigações químicas mostraram que *Pestalotiopsis* spp. é uma importante fonte para a descoberta de produtos naturais (WANG et al., 2015).

O gênero *Pestalotiopsis* contém cerca de 205 espécies (Funindex, http://194.131.255.3/cabipages/names/Names.asp), muitas com o nome da planta hospedeira no qual foram observados pela primeira vez. A compreensão das relações de espécies dentro desse gênero fracamente parasítico, tem sido complicado devido à inadequação de caracteres morfológicos disponíveis para diferenciar espécies. Os conídios (esporos assexuais) são geralmente fusiformes, retos ou ligeiramente curvos,

apresentando 3 ou 4 séptos. As células medianas são pigmentadas (ou concolor ou versicolor). Os apêndices apicais são principalmente filiformes, um a muitos (mais geralmente 2-3), ramificados ou não ramificados. Os apêndices basais de 4-9 μm são geralmente presentes e surgem de uma célula basal (JEEWON, 2006).

As espécies dentro do gênero fúngico *Pestalotiopsis* sp. tornaram-se um tópico de pesquisa em muitos laboratórios farmacológicos devido a sua capacidade de produzir metabolitos estruturalmente complexos, biologicamente ativos. Diversos estudos abrangendo um período que varia de agosto de 2010 a agosto de 2013 relatam cerca de 160 metabólitos isolados de espécies de *Pestalotiopsis* sp. durante esse período com destaque para metabólitos de atividade antitumoral, antifúngica e antimicrobiana. As vias biogenéticas associadas aos alcalóides, sesquiterpenos, quininas, xantonas e lactonas também foram relatadas (XU et al., 2014).

Um fungo comumente isolado em vegetação tropical e semitropical é *Pestalotiopsis microspora*. Embora este organismo seja um saprófito generalizado na casca e material vegetal em decomposição, também é encontrado como um endófito em muitas espécies de plantas. Esse organismo tem sido consistentemente isolado ao longo dos anos, de uma grande variedade de plantas famílias e de todas as principais áreas da terra onde existem selvas tropicais. Apesar da sua prevalência, o papel deste fungo na ecologia das plantas ainda não está claro. No entanto, os estudos deste organismo sugerem que ele tem potencial como organismo modelo para estudos biológicos e bioquímicos no laboratório (METZ et al., 2000).

Além disso, estudos realizados com *Pestalotiopsis* sp. NCi6, um fungo halotolerante e lignocelulolítico de manguezal envolvendo o sequenciamento e a montagem do seu transcriptoma indicam que este fungo possui mais de 400 enzimas lignocelulolíticas, incluindo uma grande fração envolvida na degradação da lignina (ARFI et al., 2013).

1.4.5 Trichoderma reesei

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos filamentosos mesofílicos (30° C), aeróbicos, que normalmente habitam o solo. Juntamente a *Neurospora*, *Penicillium* e *Aspergillus*, o gênero *Trichoderma* é um dos mais estudados entre os fungos filamentosos, devido ao seu grande potencial de aplicação do ponto de vista industrial e biotecnológico. Comumente, espécies do gênero *Trichoderma* são encontradas no solo ou em matéria orgânica; porém algumas espécies são encontradas em todas a latitudes e apresentam ampla ou limitada distribuição geográfica, por exemplo, *T. polysporum* e *T. minutisporum* são comuns em regiões frias, *T. aeroviride* na Inglaterra e norte da Europa, *T. minutisporum* de ampla distribuição e *T. reesei* na região equatorial, Brasil e Guiana Francesa (SAMUELS, 2006).

Inicialmente, *T. reesei* foi um modelo genético para estudo da expressão gênica regulada por glicose; posteriormente foi utilizado como hospedeiro para a produção de proteínas homólogas ou heterólogas e de enzimas envolvidas na biomassa vegetal. Porém, a partir de 2008, após o sequenciamento do genoma, com o impulso do princípio da sustentabilidade, dos biocombustíveis e utilização de recursos renováveis (biomassa vegetal), diversos grupos no mundo tem investido no estudo da biologia, estrutura gênica, fisiologia celular e manipulação genética com a finalidade de explorar a potencial aplicação de *T. reesei* na área da biotecnologia (CHAMBERGO, 2016).

Por ser considerado um organismo seguro (não patógeno), *T. reesei* passou a ser utilizado na produção industrial de enzimas e como organismo modelo em estudos de expressão gênica e degradação de celulose (NEVALAINEN et al., 1994). Em particular, *T. reesei* se destaca por sua grande capacidade de produzir e secretar um sistema multienzimático, induzível de enzimas celulolíticas que podem ser produzidas industrialmente e utilizadas na degradação de biomassa vegetal para diversas aplicações, como produção de bioombustíveis, além do potencial metabólico para a produção de importantes biomoléculas, como 1,4-ácidos dicarboxílicos (succínico, málico e fumárico), 3-ácido hidroxipropiônico, glicerol, sorbitol, xilitol e hidroxibutirolactona, atualmente obtidos de derivados do petróleo.

O sistema de celulases de *T. reesei* (MONTECOURT, 1983) é provavelmente um dos mais extensivamente estudados em seus diversos aspectos, tais como mecanismos de

ação das celulases e regulação da expressão de seus genes (ABRANHÃO-NETO et al., 1995; CARLE-URIOSTE et al., 1997; EL-DORRY et al., 1996; EL-GOGARY et al., 1989; HENRIQUE-SILVA et al., 1996). O sistema celulolítico de *T. reesei* consiste, em geral, de duas classes de enzimas: endoglucanases (EGI/Cel7B, EGII/Cel5A, EGIII/Cel2A, EGIV/Cel61A e EGV/Cel45A) e exoglucanases (celobiohidrolases: CBHI/Cel7A e CBHII/Cel6A), que agem sinergicamente, clivando ao acaso, as ligações β-glicosídicas da cadeia celulósica, liberando unidades de celobiose (glicosil-1,4-glicose). Duas enzimas β-glicosidases (BGLI/Cel3A e BGLII/Cel1A) clivam celobiose a glicose. As quatro enzimas celulases mais abundantes (CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B e EGII/Cel5A constituem mais de 50% da proteína secretada em condições de indução (FOREMAN et al., 2003).

Análise comparativa do genoma de *T. reesei* contra o banco de dados GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) permitiu identificar 39 proteínas envolvidas na degradação de celulose e hemicelulose, entre elas: exoglucanases, endoglucanases, xilanases, manases, β-glicosidases, β-xilosidases (OUYANG et al., 2006) e a análise contra o banco de dados de enzimas ativas em carboidratos (CAZymes, http://cazy.org) permite identificar 358 proteínas ativas sob carboidratos (MARTINEZ et al., 2008). Além disso, foram identificados genes envolvidos na formação de metabólitos secundários: peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS, *non-ribossomal peptide synthase*), policetídeo sintetase (PKS, *polyketide synthase*) e fusão dos genes NRPS-PKS/PKS- NRPS, sendo o número total de genes (NRPS + PKS + NRPS-PKS/PKS-NRPS) de 23 em *T. reesei* (KUBICEK et al., 2011). Adicionalmente, o número de genes de terpeno ciclases (envolvidas na biossíntese de terpenos) identificados no genoma de *T. reesei* é de 6 (BANSAL; MUKHRRGEE, 2016).

Essa capacidade genética permite a *T. reesei* a produção de diversos metabólitos secundários; porém, só dois foram reportados: i) trichodermina (um tricoteceno, produzido pela via dos izoprenóides e ii) paracelsina (produzido via NRPS) (DRUZHININA; KUBICEK, 2016).

1.5 Sacarificação da lignocelulose e coquetéis enzimáticos

O tratamento biológico da biomassa vegetal é uma etapa importante no processo de produção de etanol lignocelulósico, para tanto a otimização de um coquetel de enzimas com maior capacidade hidrolítica é necessário para garantir um processo técnico-econômico viável. Estudo do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES, Brasil) (MILANEZ et al., 2015), considera que o etanol celulósico ou etanol de segunda geração (E2G), poderá ser economicamente viável no Brasil a partir de 2025, se forem transpostas as atuais barreiras agrícolas, industriais e tecnológicas para produzi-lo, entre as quais o custo da biomassa, do capital e das enzimas, considerados os principais contribuintes na composição do custo final de produção do E2G. A busca por coquetéis de enzimas mais eficientes e a redução de seu custo ao longo do tempo é uma premissa importante do estudo, assim a estimativa do estudo só será possível através do aumento de escala de produção e redução de custos, além do maior investimento em P&D em biomassa, enzimas e equipamentos para E2G.

A pesquisa de *Trichoderma reesei* tem sido pioneira no conceito de sacarificação enzimática de celulose por uma combinação sinérgica de diferentes atividades das enzimas celulases e estabeleceu as bases para o nosso entendimento atual da regulação da expressão e secreção destas enzimas. Um passo importante para a aplicação de celulases de *T. reesei* industrialmente foi o desenvolvimento de mutagênese para a formação de cepas mais eficientes durante a década de 1970. Em primeiro lugar, no entanto, outras aplicações comerciais para as celulases foram desenvolvidas, uma vez que ficou claro que a sacarificação eficiente e completa da biomassa lignocelulósica para açúcares fermentáveis requer muitos mais processos enzimáticos do que inicialmente previstos (BISCHOF, 2016).

A sacarificação enzimática da celulose é geralmente descrita como um sistema de reação heterogêneo no qual as celulases reagem em um ambiente aquoso com a estrutura insolúvel e macroscópica contendo regiões altamente ordenadas da celulose. Para que as celulases hidrolisem de forma eficiente o substrato celulósico, as enzimas devem primeiramente ser capazes de acessar a celulose envolta em hemicelulose e lignina. Estudos prévios mostraram que a capacidade da enzima celulase celobiohidrolase I para acessar as cadeias de celulose dentro das microfibrilas é significativamente limitada,

provavelmente devido à capacidade da enzima de acessar apenas a camadas superficiais das microfibrilas. Vários fatores relacionados aos substratos (como a associação hemicelulose / lignina, grau de cristalinidade da celulose, polimerização, extensão da área de superfície) e enzimas (como inibição do produto final, necessidade de sinergismo, adsorção irreversível de enzimas) foram sugeridos para explicar a recalcitrância da celulose para hidrólise enzimática (ARANTES; SADDLER, 2010).

O etanol é uma boa alternativa aos combustíveis fósseis e, como tal, o uso de biomassa lignocelulósica como fonte barata de matéria-prima para produção de etanol continua a receber atenção globalmente devido, em parte, a sua natureza renovável e ecológica. A deslignificação de lignocelulose é um passo imperativo na bioconversão da lignocelulose para o etanol e este processo continua a ser um desafio na valorização da biomassa lignocelulosica. Foi sugerido o método biológico enzimático de deslignificação como promissor devido à demanda de baixa energia, redução no grau de polimerização da celulose, hidrólise parcial da hemicelulose e ausência de poluentes (SÁNCHEZ et al., 2011). Entre as desvantagens estão a baixa velocidade de degradação do material, ainda sendo pouco efetivo para aplicações comerciais, necessitando de processos complementares de pré-tratamento (MAURYA et al., 2015).

Na produção de biocombustíveis as enzimas oxidorredutases tem dois objetivos principais: delignificação e desentoxicação. Métodos de delignificação aplicam fungos lignolíticos e suas enzimas para reduzir o teor de lignina na matéria prima. Desentoxicação utiliza enzimas oxidorredutases para reduzir compostos tóxicos presentes na biomassa hidrolisada após pré-tratamentos químicos e físico-químicos. Durante o processo de delignificação são aplicados extratos enzimáticos e enzimas purificadas ou semi-purificadas para realizarem a degradação da lignina, sendo utilizadas enzimas comerciais ou nativas. Lacase é a enzima mais utilizada, seguida por MnP e LiP. Mesmo assim, misturas de duas ou três enzimas lignolíticas tem sido utilizadas em alguns estudos (PLACIDO; CAPAREDA, 2015).

Coquetéis de enzimas para utilização na degradação de biomassa são oferecidos por diversas empresas (Verenium, Dyadic International e Genecor nos Estados Unidos da América, Iogen Corporation no Canadá e Novozymes na Dinamarca) que realizam

pesquisa e aplicam recursos para o desenvolvimento de coquetéis de enzimas contendo novas e mais estáveis enzimas (CARDONA et al., 2007).

O conceito de "coquetel mínimo de enzimas" (MEYER et al., 2007) é definido como o menor número de enzimas suficientes para a digestão completa de Biomassa. Um dos métodos para a montagem de coquetéis enzimáticos é utilizar uma série de microorganismos produtores das enzimas de interesse, especialmente fungos. O fungo *Trichoderma reesei* é amplamente conhecido por produzir grandes quantidades de celulases (essencialmente celobiohidrolases), mas é relativamente pobre em outras enzimas necessárias para a conversão da biomassa. Assim, outros fungos estão sendo estudados pela sua capacidade de produzir coquetéis mais diversificados e eficientes ou complementar as enzimas de *T. reesei* (DEBEIRE et al., 2014).

Segundo Woolridge (2014), enzimas oxidorredutases como lacases e peroxidases poderiam ser utilizadas na complementação de coquetéis enzimáticos compostos por enzimas hidrolíticas, contribuindo com sua eficiência e consequentemente diminuindo seus custos. Nesse contexto, a identificação de fungos nativos que apresentam uma boa produção de enzimas oxidorredutases é importante, pois permitira à complementação do coquetel de enzimas necessário para eficiente degradação de biomassa e avaliar seu potencial de uso em biotecnologia.

Portanto, o presente trabalho teve como proposta a identificação de diferentes cepas de fungos filamentosos e a caracterização da produção de enzimas oxidoredutases sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar e avaliar sua potencial utilização biotecnológica como complemento ao coquetel enzimático de degradação de biomassa.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Identificar fungos filamentosos que produzem enzimas oxidorreductases com potencial utilização na degradação da biomassa vegetal.

2.1 Objetivos específicos

1. Identificar fungos filamentosos com capacidade de produção de enzimas oxidorredutases.

2. Determinar o perfil de secreção das enzimas oxidorredutases.

3. Purificar e caracterizar a atividade das enzimas oxidorredutases.

4. Avaliar a potencial utilização das enzimas oxidorredutases como suplemento no processo de degradação de biomassa vegetal.

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas e condições de cultura

As cepas de fungos utilizadas no trabalho foram obtidas em estudos prévios e constituem a biblioteca "Bioquímica, biotecnologia, fungos" (BBF), composta por 400 cepas conservadas no laboratório de biotecnologia da EACH. No presente trabalho foram utilizadas as cepas *Trichoderma reesei* QM9414 (ATCC,26921) e as cepas identificadas neste trabalho: *Neopestalotiosis* sp. (BBF201), *Cochliobolus sativus* (BBF210) e *Pestalotiopsis* sp. (BBF245). Para fins práticos no presente trabalho as cepas serão denominadas como *T. reesei*, *Pestalotiopsis* sp., *Neopestalotiopsis* sp. e *C. sativus*.

As cepas em estudo são mantidas em placas contendo meio de cultura Agar Batata Dextrose, (Batata 200 g/L, dextrose 15 g/L, ágar 4 g/L, *Potato Dextrose Agar*, PDA) e meio de cultura ágar-ágar 1,5% contendo sais ($FeSO_4$ 0,5%; $MnSO_4$ 0,16%; $ZnSO_4$ 0,16%; e $CaCl_2$ 0,2%) e avicel 1,5%. Uma porção de 1 cm^2 da cultura do fungo em meio PDA foi utilizada como inoculo inicial para o meio Batata Dextrose Caldo (Batata 200 g/L, dextrose 15 g/L *Potato Dextrose Broth*, PDB), incubada por 7 dias/30 ºC, 150 rpm. A massa micelial foi recuperada por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos e inoculada em meio de cultura. O fungo *T. reesei* foi cultivado em meio mínimo ($(NH_4)_2SO_4$ 0,21%/, $MgSO_4$ 0,03% e $CaCl_2$ 0,03%) em tampão fosfato de potássio (0,1 M K_2HPO_4/ KH_2PO_4, pH 6,0) e o fungo *Pestalotiopsis* sp. foi cultivado em meio de cultura Kirk (TIEN; KIRK, 1988) (Peptona 0,2%; KH_2PO_4 0,2%; $MgSO_4$ 0,05%; $CaCl_2$ 0,01%), sendo ambos suplementados com solução de metais ($FeSO_4$ 0,5%; $MnSO_4$ 0,16%; $ZnSO_4$ 0,16%; e $CaCl_2$ 0,2%), incubados a 30 °C, 150 rpm, por tempo determinado segundo cada experimento. Quando necessário foi acrescentado ao meio de cultura bagaço de cana de açúcar in natura triturado, proporcionado pela usina Granelli LTDA.

Para a obtenção do sobrenadante bruto de *T. reesei* 2 mL de esporos (4,24 x 10^8 de esporos) suspensos em NaCl 0,9% foram inoculados em PDB e crescidos durante 5 dias a 30 °C e 150 rpm. Em seguida a massa micelial foi centrifugada a 4000 rpm, recuperada e inoculada em meio mínimo contendo avicel 1%. Alíquotas foram retiradas do meio de cultura e realizados ensaios para determinar a atividade enzimática de celulases. No 3° dia de cultivo o sobrenadante foi obtido por filtração em condições estéreis e utilizado em

ensaios enzimáticos para determinar atividade celulases e em ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

Para a obtenção do sobrenadante bruto de *Pestalotiopsis* sp. 1 cm^2 da colônia crescida em PDA foi inoculado em PDB e crescido durante 7 dias. Em seguida a massa micelial foi centrifugada a 4000 rpm, recuperada e inoculada em meio kirk contendo bagaço de cana-de-açúcar (0,5%) e suplementado com 100 µL de solução de metais. Ao 4° dia de cultivo o meio de cultura foi suplementado com $CuSO_4$ 250 µM e veratril álcool 0.5 mM. Alíquotas foram retiradas do meio de cultura e realizados ensaios para determinar a atividade enzimática de celulases e oxidorredutases. No 8° dia de cultivo o sobrenadante foi obtido por filtração em condições estéreis e utilizado em ensaios de atividade enzimática para determinar atividade celulases, oxidorredutases, em ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar e análise por PAGE-nativo e SDS-PAGE.

3.2 Técnicas gerais de bioquímica e biologia molecular

A quantificação de proteínas, glicose, eletroforese de DNA e proteínas, isolamento de DNA, preparação de géis, preparo de soluções e outras técnicas empregadas em bioquímica ou biologia molecular foram feitas segundo descrito por Sambrook et al., (1989), ou de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes dos produtos utilizados ou descritos na literatura.

Para amplificações de DNA foi utilizado o kit *pfx* DNA polimerase (Life technologies, USA), seguindo as instruções do fornecedor, adaptando temperaturas e ciclos de acordo com a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

3.3 Seleção de fungos filamentosos produtores de enzimas oxidorredutases e celulases

3.3.1 Detecção de atividade oxidorredutase em placa

Para a determinação qualitativa de atividade de enzimas oxidorredutases foram realizados ensaios utilizando mediadores e compostos modelo de lignina fenólica como ABTS (2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 20 mM, DMP (2,6 dimethoxyphenol) 20 mM, DMPPDA (N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine) 20 mM e Guaiacol 0,5 mM. Para as condições iniciais de cultura as cepas foram cultivadas em

placas por triplicata em meio mínimo sólido ($(NH_4)_2SO_4$ 0,21%, $MgSO_4$ 0,03% e $CaCl_2$ 0,03%, agar-agar 1,5%, e bagaço de cana-de-açúcar 0,5%) e incubadas a 30 ºC pelo período de 7 dias. Em cada placa foi adicionada uma solução de 200 µL do respectivo substrato sobre a cultura do fungo e aguardado o período de 15 a 30 minutos, para observar aparição de cor (RAMOS et al., 2011). Além disso, foram efetuados testes em placas contendo meio mínimo sólido sem bagaço de cana-de-açúcar suplementado com Guaiacol (0.5 mM).

3.3.2 Detecção de atividade celulase em placa

Para a determinação qualitativa de atividade celulase as cepas foram cultivadas em triplicata em placas de de agarose 1% em tampão citrato 50 mM (pH 4.5) e 1% de carboximetil-celulose 1% (CMC) e incubadas a 30 °C pelo período de 7 dias. Em seguida cada placa foi testada por meio de vermelho de congo, onde foram cobertas com solução I (vermelho de congo 0.1%; etanol 1%) por 30 minutos. Após o descarte da solução I cada placa foi coberta com solução II (NaCl 1 M) por 30 minutos (GUPTA et al., 2012; ZHANG et al., 2009).

3.4 Identificação taxonômica e molecular do fungo em estudo

3.4.1 Identificação morfológica

As características culturais de crescimento das cepas crescidas em PDA foram registradas durante 7 dias. As características microscópicas das colônias foram determinadas pela técnica microcultivo (RIDDEL, 1950), onde o micélio de cada cepa foi inoculado em PDA e uma lamínula foi posicionada sob a massa fúngica. As amostras foram mantidas em placas de vidro a 30 °C e a intervalos de 3 dias adicionado H_2O destilada, para manter a umidade. Posteriormente as lamínulas foram coradas com azul de lactofenol e as estruturas vegetativas e reprodutivas de cada cepa foram observadas ao microscópio e fotografadas.

3.4.2 Identificação molecular

Para a identificação molecular, foi realizada a extração de DNA de cada fungo (ZHANG et al., 2010). Os fungos foram cultivados sob lâmina de papel celofane em meio PDA durante 2 dias/30 ºC. A massa de micélio foi triturada e transferida para microtubos de 1.5 ml e acrescidos 500 µL de tampão de extração (CTAB 3%; NaCl 1 M 28%; EDTA

0.5 M pH 8.0 4%; Tris-Cl 1M pH 8.0 10%; β-Mercaptoethanol 0,2%). As amostras foram aquecidas a 65°C durante 1 hora, em seguida adicionados 500 µL de clorofórmio/alcool isoamílico (24:1) e agitados em vórtex por 2 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas 10000 rpm/10 minutos, 400 µL da fase superior foram transferidos a novo microtubo e adicionados 500 µL de isopropanol. As amostras foram armazenadas a 4 °C / 12 h. O DNA foi precipitado por centrifugação a 12000 rpm/15 minutos, o sobrenadante descartado e o DNA lavado com 500 µL de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm/10 minutos, o sobrenadante foi descartado, sendo o DNA suspenso em 30 µL de água destilada estéril.

A PCR foi realizada utilizando oligonucleotídeos de sequências conservadas de DNA ribossomal (rDNA). A região espaçadora interna transcrita (ITS *Internal transcribed spacer*, 1706 pb), a subunidade maior de RNA (LSU, *Large subunit RNA* 25-28S, 938 pb), β-tubulina (*β-Tubulin*, ~ 450 pb) e fator de elongação 1-alfa (EF-1α, Partial translation elongation factor 1-alpha gene, ~ 350 pb) foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos, ITS-1 e ITS-4, LROR-F e LR5-R, BT2A e BT2B, EF1-728F e EF1-986R respectivamente (Vilgalys lab, Duke University, http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm). As informações referentes aos oligonucleotídeos utilizados no estudo e as condições utilizadas nas reações de PCR são mostradas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na identificação da cepa em estudo.

Nome	Sequencia DNA (5´- 3´)	Amplicon	Localização	Referencia
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	1706pb	ITS, *Internal transcribed spacer*,	WHITE et al., 1990
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	1706pb	ITS, *Internal transcribed spacer*,	WHITE et al., 1990
LROR-F	GTACCCGCTGAACTTAAGC	938pb	(LSU, *Large subunit RNA* 25-28S	VILGAYS; HESTER, 1990
LR5-R	ATCCTGAGGGAAACTTC	938pb	(LSU, *Large subunit RNA* 25-28S	VILGAYS; HESTER, 1990
BT2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	~450pb	β-tubulina	GLASS; DONALDSON, 1995
BT2B	TACTTGAAGGAACCCTTACC	~450pb	β-tubulina	GLASS; DONALDSON, 1995
EF1-728F	AGACTAAATATCCCTGCCGG	~350pb	Elongation factor 1-alfa (EF 1-alfa)	CARBONE; KOHN, 1999
EF1-986R	TGCCAAAACATACCAGACAA	~350pb	Elongation factor 1-alfa (EF 1-alfa)	CARBONE; KOHN, 1999

Tabela 2 - Condições de PCR realizados no estudo.

Oligonucleotídeo	Desnaturação inicial	Anelamento	Extensão	Desnaturação	Extensão final
ITS-1 e ITS-4	2 a 3 minutos a 95°C	30 segundos a 50°C	2 minutos a 72°C (35 ciclos)	30 segundos a 95°C	10 minutos a 72°C
LROF-F e LR5-R	1 minuto a 94°C	45 segundos a 50°C	1 minuto a 72°C (35 ciclos)	30 segundos a 94°C	7 minutos a 72°C
BT2A e BT2B	1 minuto a 94°C	1 minuto a 58°C	1 minuto a 72°C (32 ciclos)	30 segundos a 94°C	5 minutos a 72°C
EF1-728F e EF1-986R	8 minutos a 95°C	20 segundos a 58°C	1 minuto a 72°C (35 ciclos)	30 segundos a 95°C	5 minutos a 72°C

3.5 Determinação de curvas padrão

3.5.1 Curva padrão de proteínas

Para a construção da curva padrão da proteína uma solução estoque de BSA (*bovine serum albumin* – 1mg/mL) foi diluída em água destilada nas concentrações de 0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 100 µg/mL e 160 µg/mL. A solução de trabalho foi preparada diluindo a solução padrão bradford (BIO RAD) em água destilada na proporção 1:4. Para a quantificação das proteínas foram aplicados 20 µL de cada concentração de BSA em 180 µL da solução de trabalho em duplicata e aguardado o período de 5 minutos. A reação foi lida por espectrofotometria a 495 nm. Os dados foram utilizados para a construção da curva utilizando o programa Microsoft Excel 2011.

3.5.2 Curva padrão de glicose

A solução padrão de glicose (0,2%) foi diluída em H_2O destilada estéril. Sete amostras foram preparadas com concentrações crescentes de glicose em microtubos de 1,5 mL (200, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1400 µmol/L) e preparadas em triplicata, com um volume total de 200 µL. Em seguida adicionou-se 400 µL de solução 1% de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (GHOSE, 1987), em cada amostra, que após ferver por 5 minutos, foram adicionados 400 µL de água. A leitura de absorbância foi feita em um espectrofotômetro a 540 nm. Os valores obtidos foram utilizados na construção de curva padrão utilizando o programa Microsoft Excel 2011.

3.6 Determinação de proteínas totais

A quantificação de proteínas presentes nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976). A solução de trabalho foi preparada diluindo a solução padrão bradford (BIO-RAD) em água destilada na proporção 1:4. Para a quantificação das proteínas foram aplicados 20 µL do sobrenadante de cada amostra em 180 µL de solução de trabalho em duplicata e aguardado o período de 5 minutos. A reação foi lida por espectrofotometria a 495 nm o valor absorbância obtida foi analisado através da curva padrão para determinar a concentração de proteínas na amostra.

3.7 Atividade de enzimas celulases

3.7.1 Endoglucanase

A atividade de endoglucanase foi determinada através da liberação de açúcares redutores de carboximetilcelulose (CMC) pelo método DNS (GHOSE, 1987). Em cada tubo foram adicionados 40 µL de solução 1% de CMC em 20 µL de tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) e 140 µL de extrato enzimático. As amostras foram incubadas durante 1 hora a 40 ºC. Em seguida foram adicionados 400 µL de solução 1% de DNS. As amostras foram fervidas em banho-seco durante 5 minutos, e para finalizar a reação foram adicionados 400 µL de H_2O. A concentração de açúcares redutores, produzidos pela reação enzimática foi determinada utilizando a curva padrão de glicose e usada para calcular a atividade de endoglucanase através da absorbância lida em 540 nm.

3.7.2 Exoglucanase

A atividade de exoglucanase foi determinada através da liberação de açúcares redutores de celulose microcristalina (avicel) pelo método DNS (GHOSE, 1987). Em cada tubo foram adicionados 40 µL de solução 1% de avicel em 20 µL de tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) e 140 µL de extrato enzimático. As amostras foram incubadas durante 1 hora a 40 ºC. Em seguida foram adicionados 400 µL de solução 1% DNS. As amostras foram fervidas em banho-seco durante 5 minutos, e para finalizar a reação foram adicionados 400 µL de H_2O. A concentração de açúcares redutores, produzidos pela reação enzimática foi determinada utilizando a curva padrão de glicose e usada para calcular a atividade de exoglucanase através da absorbância lida em 540 nm.

3.8 Atividade de enzimas oxidorredutases

A determinação quantitativa da atividade de enzimas oxidorredutases foi realizada através de espectrofotometria no leitor de microplacas TECAN Infinite M200pro. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (fundo plano) (SPL Life Sciences) em triplicata e as leituras monitoradas em 10 ciclos de 30 segundos.

3.8.1 Lacase

A reação para a determinação da atividade de lacase foi realizada segundo o protocolo de Collins (1998). Foi adicionado em cada poço 60 µL de tampão tartarato de sódio 250 mM (pH 4.2), 30 µL do extrato enzimático e 70 µL de H_2O. A solução foi incubada durante 3 minutos a 30 ºC e a reação foi iniciada adicionando 30 µL de ABTS 5 mM. A atividade foi monitorada a 420 nm a partir da oxidação de ABTS em $ABTS^+$.

3.8.2 Manganês peroxidase

A reação para a determinação da atividade de manganês peroxidase foi realizada segundo o protocolo de Hwang et al. (2008). Em cada poço foram adicionados 100 µL de tampão tartarato de sódio 250 mM (pH 4.2), 2 µL de guaiacol 400 mM, 20 µL de sulfato de manganês 10 mM e 70 µL do extrato enzimático. A solução foi incubada durante 3 minutos a 30 ºC e a reação foi iniciada adicionando 10 µL de H_2O_2 1 mM. A atividade foi monitorada a 465 nm a partir da oxidação do Guaiacol em 3,3′-dimethoxi-bifenol-4,4′-quinona.

3.8.3 Lignina peroxidase

A reação para a determinação da atividade de lignina peroxidase foi realizada partir do protocolo de Tien e Kirk (1988). Em cada poço foi adicionado 100 µL de tampão tartarato de sódio 250 mM (pH 4.2), 20 µL de veratril alcool 100 mM e 70 µL do extrato enzimático. A solução foi incubada durante 3 minutos a 30 ºC e a reação foi iniciada adicionando 10 µL de H_2O_2 1 mM. A atividade foi monitorada a 310 nm a partir da oxidação de veratril alcool em veratrilaldeído.

Calculo de atividade de enzimas oxidases (Caplan *et al*, 1994):

$$U/L = \frac{\Delta ABS}{\varepsilon \cdot R} \times 10^6$$

Onde:

ΔABS = Curva de inclinação da absorbância durante 5 minutos.

ε = Coeficiente de extinção molar.

R = Quantidade de extrato enzimático na amostra.

U/L **=** Unidades por litro, onde U significa a quantidade de enzima capaz de converter 1µMol de substrato por minuto.

Coeficiente de absorção molar:

ε 420 nm **=** 36.000 L . M . cm^{-1}

ε 465 nm **=** 12.100 L . M . cm^{-1}

ε 310 nm **=** 9.300 L . M . cm^{-1}

3.9 Purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica

A purificação das proteínas presentes no sobrenadante da cultura do fungo *Pestalotiopsis* sp. foi realizada por cromatografia de troca iônica utilizando o equipamento AKTA FPLC e uma coluna Q-sepharose FF (GE Healthcare) de 3 mL de volume de coluna (VC). O sobrenadante da cultura de 8 dias foi filtrado e centrifugado a 8000 rpm durante 10 minutos, clarificado por filtração em filtro de 45 µm e tamponado com Tris-Cl 20 mM, pH 8.0. A coluna foi equilibrada com 5 VC de tampão Tris-Cl 20 mM pH 8.0 (tampão A: de equilíbrio e lavagem), O sobrenadante foi injetado a um fluxo de 1 mL/minuto. A lavagem foi feita com 10 VC de tampão A e a eluição foi realizada em etapas graduais utilizando Tris-Cl 20 mM/NaCl 1M pH 8.0 (tampão B: de eluição), sendo escalonada em 5 VC de tampão B 25%, 5 VC de tampão B 50%, 5 VC de tampão B 75% e 5 VC de tampão B 100%. Todo o processo foi monitorado por leitura de proteína a 280 nm. As frações que apresentaram os maiores picos de eluição de proteína foram coletados para realização dos ensaios de atividade enzimática oxidorredutases e celulases.

3.10 Análise do secretoma e da atividade enzimática por zimograma

A análise do conteúdo proteico e do secretoma foi realizado por SDS-PAGE 12,5%, onde foram aplicados 10 µg de proteína e corridos a 80 V. A visualização das bandas foi possível após coloração do gel com comassie blue-R250 (250 mL metanol, 50 mL ácido acético, 0,08 g comassie blue, 200 mL H_2O destilada) durante 3 horas e lavagem em descorante (75 mL ácido acético, 50 mL metanol e 875 mL de H_2O destilada) durante 16 horas.

Análise da atividade enzimática por zimograma foi realizada por PAGE-nativo (12,5%), sob condições não desnaturantes a 4 °C. Foram aplicados 10 µg de proteína e a corrida foi realizada a 50 V durante 8 horas. Após a corrida o gel foi submetido a duas lavagens em tampão tartarato de sódio 50 mM, pH 4.2 durante 1 hora, sendo em seguida incubado em ABTS 2 mM a 37 °C na ausência de luz. Esperou-se a visualização das bandas que apresentam atividade enzimática de lacase em coloração verde após 30 minutos.

3.11 Ensaio de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

Para a realização dos ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados sobrenadantes obtidos a partir dos fungos *Trichoderma reesei* e *Pestalotiopsis* sp.

Foram realizados 5 ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Para a realização do ensaio 1 foram utilizados uma solução estoque (preparação enzimática de *T. reesei* do ano 2010, armazenada no laboratório a 15 °C) e uma fração contendo enzimas purificadas do fungo *Pestalotiopsis* sp.

Para a realização dos ensaios 2, 3 e 4, 1 mL de esporos do fungo *T. reesei* (4,24 x 10^8 de esporos) foram cultivados em 100 mL de meio mínimo contendo glicerol 1%. Após 48 horas a massa micelial foi centrifugada a 4000 rpm, recuperada e inoculada em meio mínimo contendo avicel 1% e suplementado com 100 µL de solução de metais e 30 µL de $CaCL_2$ 1M. Alíquotas foram retiradas do meio de cultura e realizados ensaios para determinar a atividade enzimática de celulases. No 3° dia de cultivo a cultura foi centrifugada a 4000 rpm e filtrada em condições estéreis para a obtenção do sobrenadante.

Para a realização dos ensaios 2, 3 e 4 1cm^2 da colônia do fungo *Pestalotiopsis* sp. crescida em PDA foi inoculado em PDB e crescido durante 7 dias. Em seguida a massa micelial foi centrifugada a 4000 rpm, recuperada e inoculada em meio kirk contendo bagaço de cana-de-açúcar (0,5%) e suplementado com 100 µL de solução de metais. Ao 4° dia de cultivo o meio de cultura foi suplementado com $CuSO_4$ 250 µM e veratril álcool 0.5 mM. Alíquotas foram retiradas do meio de cultura e realizados ensaios para determinar a atividade enzimática de celulases e oxidorredutases. No 8° dia de cultivo a

cultura foi centrifugada a 4500 rpm e filtrada em condições estéreis para a obtenção do sobrenadante.

Para a realização do ensaio final 2 mL esporos do fungo *T. reesei* (4,24 x 10^8 de esporos) foram cultivados em 200 mL de PDB durante 5 dias. Em seguida, os esporos foram recuperados por centrifugação e inoculados em 500 mL de meio de mínimo com avicel 1% e suplementado com 500 µL de solução de metais e 150 µL de $CaCl_2$. Alíquotas foram retiradas do meio de cultura e realizados ensaios para determinar a atividade enzimática de celulases. No 3° dia de cultivo a cultura foi centrifugada a 4500 rpm e filtrada em condições estéreis para a obtenção do sobrenadante.

Para a realização do ensaio final o fungo *Pestalotiopsis* sp. foi crescido em 200 mL de PDB durante 7 dias. Em seguida, a massa da cultura foi recuperada por centrifugação e inoculada em 500 mL de meio kirk com bagaço de cana de açúcar (0,5%) e suplementado com 500 µl de solução de metais. Ao 4° dia de cultivo o meio de cultura foi suplementado com $CuSO_4$ 250 mM e veratril álcool 0.5 mM. Alíquotas foram retiradas do meio de cultura e realizados ensaios para determinar a atividade enzimática de celulases e oxidorredutases. No 8° dia de cultivo a cultura foi centrifugada a 4500 rpm e filtrada em condições estéreis para a obtenção do sobrenadante.

Logo após os sobrenadantes obtidos foram concentrados 5x utilizando uma membrana de ultrafiltração vivaflow 50 10,000 MWCO (Sartorius). Para os ensaios de sacarificação foram montadas reações com uma amostra controle composta de enzimas celulases (sobrenadante *T. reesei*, tampão citrato 0,05 M, bagaço de cana de açúcar 1%), e um coquetel enzimático composto de enzimas celulases e oxidorredutases (sobrenadante *T. reesei*, sobrenadante *Pestalotiopsis* sp. tampão citrato 0,05 M, bagaço de cana-de-açúcar 1%). As amostras foram incubadas a 50 °C e alíquotas foram retiradas e utilizadas para quantificação de açúcares redutores e atividade enzimática de celulases e oxidorredutases.

A análise de açúcares redutores liberados nas amostras foi realizada através do método DNS (GHOSE, 1987).

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade de oxidorredutases e seleção de cepas fúngicas

A biblioteca “bioquímica, biotecnologia, fungos” (BBF), constituída por 400 cepas de fungos foi avaliada quanto a atividade de enzimas oxidorredutases e celulases. Todas as cepas foram cultivadas em meio mínimo contendo ágar-ágar e bagaço de cana-de-açúcar (0,5%) e avaliados quanto a sua capacidade de oxidar diferentes compostos modelo de lignina fenólica, como DMP, DMPPDA e Guaiacol e também quanto a sua capacidade em oxidar ABTS, um mediador sintético utilizado para atividade de lacase. Além disso, os fungos foram avaliados quanto a sua capacidade de hidrolisar CMC através da reação com vermelho de congo. Os fungos foram cultivados durante 7 dias a 30 °C. Nas reações para ABTS, DMP e DMPPDA foram adicionados 200 µL do substrato sobre as colônias e aguardado o período de 15 a 30 minutos para a aparição da cor da reação. Na reação para guaiacol os fungos foram cultivados em meio mínimo sólido contendo guaiacol 0,5 mM durante 7 dias. Na reação para CMC os fungos foram cultivados em meio mínimo sólido contendo CMC (1%) durante 7 dias, sendo a o meio coberto com solução de vermelho de congo (1%) durante 30 minutos e em seguida coberto com NaCl 1M durante 30 minutos para a formação do halo. As reações positivas para CMC, ABTS, DMP, DMPPDA e guaiacol foram observadas através do surgimento de halos ao redor dos fungos nas cores branco, verde, amarelo, rosa e marrom respectivamente (RAMOS et al., 2011; ZHANG, 2009).

A figura 7 e a tabela 3 mostram os resultados obtidos para as 3 cepas selecionadas para a realização do presente estudo e os respectivos substratos utilizados. A tabela 3 mostra que as cepas BBF201, BBF210 e BBF245 apresentaram reação positiva na presença do ABTS, sendo que a cepa BBF245 apresentou a reação mais intensa com esse substrato. Além disso, tanto BBF201 quanto BBF210 e BBF245 apresentaram resultados positivos em meio suplementado com guaiacol, onde novamente a cepa BBF245 apresentou a reação mais intensa. Apenas BBF201 e BBF245 apresentaram reação em meio com DMP, com a cepa BBF245 apresentando reação mais intensa. Além disso, as 3 cepas apresentaram capacidade de hidrolisar CMC, onde a cepa BBF210 apresentou reação fraca e BBF201 e BBF245 apresentaram reação média. Nenhuma das cepas apresentou reação em DMPPDA (Figura 7).

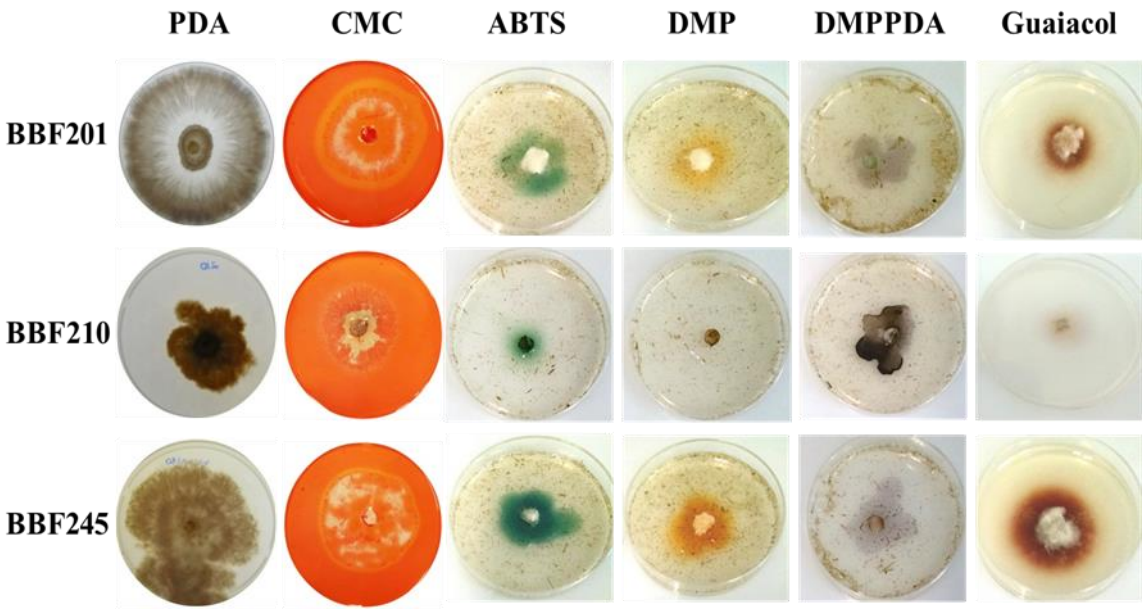


Figura 7 - Ensaio de atividade enzimática em fungos filamentosos. Ensaio em meio mínimo sólido contendo 1% de bagaço de cana-de-açúcar (ABTS, DMP, DMPPDA). Culturas foram crescidas 30 ºC por 7 dias e cobertas com solução de cada reagente por 15 a 30 minutos. ABTS: 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; CMC: Carboxi-metil celulose; DMP: Dimethyl phthalate; DMPPDA: N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine; PDA: *Potato, dextrose, Agar*.

Tabela 3 - Determinação de atividade enzimática em fungos filamentosos.

Cepa	CMC	ABTS	DMP	DMPPDA	Guaiacol
BBF201	++	++	++	-	++
BBF210	+	+	-	-	+
BBF245	++	+++	+++	-	+++

+++ Reação forte / ++ Reação média / + Reação fraca / - negativo.
ABTS: 2,2′-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; DMP: Dimethyl phthalate; DMPPDA: N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine.

A tabela 3 mostra os resultados das 3 cepas selecionadas na reação com os diferentes substratos. A reação positiva para os substratos ABTS, DMP e guaiacol indicam a produção de enzimas oxidorredutases. ABTS é um substrato amplamente utilizado como indicador para detectar atividade de enzimas lacases, embora em alguns casos também possa ser utilizado para medir a atividade enzimática de peroxidases na presença de H_2O_2 (DE JONG et al., 1992; MÜLLER, 1985). Segundo de Jong et al. (1992) guaiacol e DMP também podem ser utilizados como substratos para a atividade de lacase,

sendo o guaiacol também utilizado como um substrato para manganês peroxidase e lignina peroxidase.

Segundo Ramos et al. (2011) enzimas pertencentes a família das multicobre oxidases possuem baixa especificidade pelo substrato, sendo lacases e outras enzimas pertencentes ao grupo capazes de oxidar todos os substratos testados (ABTS, DMP, DMPPDA e Guaiacol) e variações na quantidade de substratos oxidados e na intensidade de cada reação de cada cepa podem ser devido a diferenças bioquímicas existentes. Além disso, variações na expressão de determinados genes, presença de isoenzimas e condições ambientais como concentração de $CuSO_4$ e tempo de cultivo possuem influencia sobre a atividade de cada cepa, mostrando a necessidade de mais estudos bioquímicos e o possível potencial biotecnológico de cada cepa.

Para a montagem de coquetéis enzimáticos são necessários fungos capazes de degradar a lignocelulose de forma seletiva, apresentando maior capacidade para degradar lignina, hemicelulose ou celulose. Análises da figura 7 e tabela 3 mostram que a cepa BBF201 apresentou reações de média intensidade em ABTS, DMP e guaiacol, além de reação média em CMC, indicando a cepa como produtora de enzimas oxidorredutases e celulases. A cepa BBF210 apresentou reações de fraca intensidade em ABTS e guaiacol, além de reação fraca em CMC, indicando a cepa como produtora de enzimas oxidorredutases e celulases, porém com baixa atividade durante o tempo de cultivo. A cepa BBF245 apresentou reação forte em ABTS, DMP e guaiacol, e reação média em CMC, indicando a cepa como produtora de alta quantidade de oxidorredutases, além da capacidade de produzir celulases. Com base nos presentes resultados, foi selecionada a cepa que apresentou uma maior capacidade de produzir enzimas oxidorredutases e menor capacidade em produzir celulases. Assim, devido a presença de reações fortes em ABTS, DMP e guaiacol e reação menos intensa em CMC a cepa BBF245 foi selecionada para a continuação do presente estudo.

4.2 Identificação taxonômica e molecular

As características morfológicas da cepa em estudo estão mostradas na figura 8. A cepa selecionada foi crescida em PDA a 30 °C durante 7 dias e colocada em temperatura ambiente e exposta a luz após o 8° dia. Abaixo estão descritas as características morfológicas da colônia em PDA ao longo de 15 dias de crescimento.

Frente: A cepa em estudo apresenta colônia de textura membranosa e relevo cerebriforme, formando uma topografia de altos e baixos ao longo de seu crescimento. Apresenta micélios aéreos escassos nos primeiros dias de crescimento, tornando-se relativamente moderados a partir do sétimo dia. Apresenta coloração branca variando a creme e crescimento em projeções circulares ao longo da placa e bem aderidas ao meio de cultura, recobrindo-o como uma película.

Verso: Apresenta crescimento em formações circulares a partir do centro e coloração amarela variando ao alaranjado. A partir do 10° dia de cultivo verifica-se o surgimento de pigmentos globosos em coloração variando de marrom a preto, tornando-se mais numerosos conforme o amadurecimento da cultura. Essas estruturas foram posteriormente identificadas como conidiomas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

Os aspectos microscópicos da cepa em estudo também foram observados. A cepa em estudo foi submetida ao microcultivo e analisada por microscopia de luz sob a coloração de lactofenol azul de algodão. As culturas foram observadas em duplicata ao 4° e 7° dia de cultivo. A figura 8 apresenta as estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo. Até o 4° dia de cultivo não foi possível a visualização de estruturas reprodutivas em nenhuma das amostras. O fungo apresenta hifas septadas e o desenvolvimento de estruturas de reprodução foi observada a partir do 7° dia de cultivo.

Descrição das estruturas microscópicas: Hifas septadas, com células conidiônicas apresentando 3 ou 4 séptos em coloração marrom e morfologia variando entre células em formato de bacilo ou pena, podendo apresentar estruturas semelhantes a antenas. Conídios apresentam coloração marrom, variando entre 3 e 4 séptos e morfologia em forma de bacilo.

A taxonomia e a identificação de fungos do gênero *Pestalotiopsis* sp. mostra-se complicada, uma vez que não existe um consenso exato sobre as características de cada espécie. Foi observado que uma mesma colônia pode apresentar variações na morfologia das estruturas reprodutivas, sendo que espécies diferentes podem apresentar morfologia sobreposta. Além disso, a associação em relação ao hospedeiro e a localização geográfica da coleta é ainda menos informativa, com a taxonomia do gênero permanecendo confusa (JEEWON, 2004; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2013; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014 STROBEL, 1996).

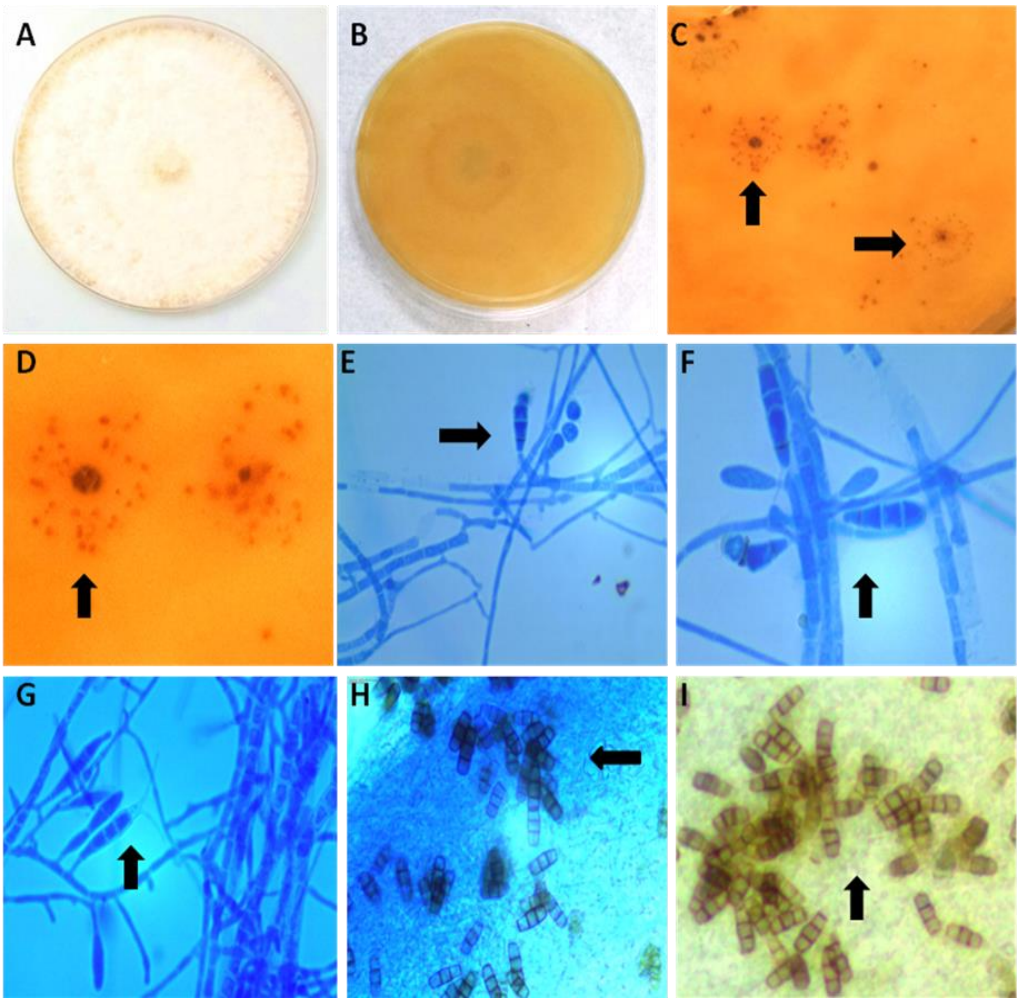


Figura 8 - Características morfológicas do fungo *Pestalotiopsis* sp. (A): cultura crescida em PDA após 7 dias, lado anverso. (B): Cultura crescida em PDA após 7 dias, lado reverso. (C), (D): cultura crescida em PDA após 20 dias, setas indicam conidiomas. (E), (F), (G): Microcultivo observado ao 7° dia de crescimento, setas indicam células conidiogênicas. (H), (I): Microcultivo observado ao 7° dia de crescimento, setas indicam conídios.

A figura 9 mostra os resultados da preparação do DNA genômico do fungo em estudo e a amplificação das regiões ITS, LSU, β-tubulina e fator de elongação 1 alfa do genoma do fungo respectivamente.

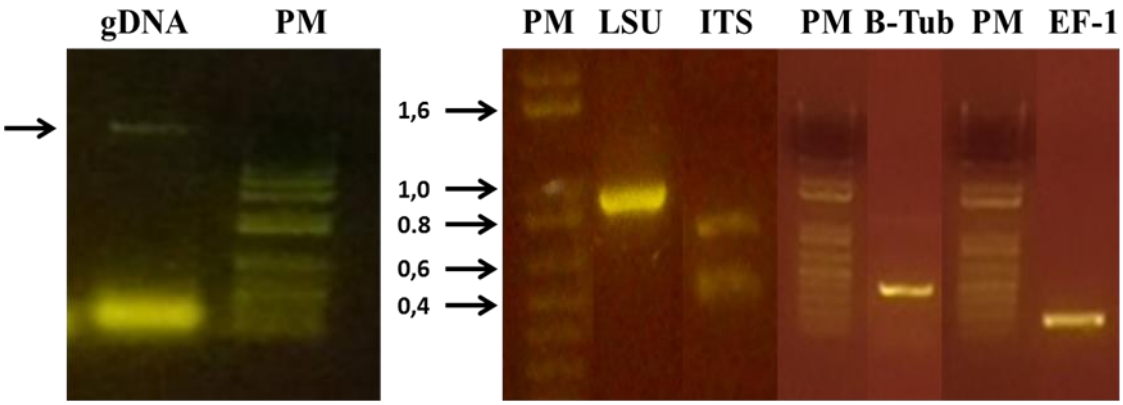


Figura 9 - Eletroforeses de DNA do fungo *Pestalotiopsis* sp. em gel de agarose 1%. gDNA= DNA genômico; produto de PCR da região espaçadora interna transcrita (ITS, Internal transcribed spacer, 750 pb), a subunidade maior de RNA (LSU, Large subunit RNA 25-28S, 938 pb), do gene β-tubulina (β-Tub, 450 pb) e gene fator de elongação 1alfa (EF-1, Partial translation elongation factor 1-alpha gene, 350 pb) . PM= Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (ThermoScientific, USA).

Os produtos de PCR foram sequenciados na central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As sequencias obtidas foram comparadas com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, USA), utilizando o programa BLASTn. A tabela 4 mostra os dados obtidos e a identificação do fungo em estudo. Conforme os dados obtidos por biologia molecular, podemos concluir que o fungo BBF245 pertence ao gênero *Pestalotiopsis* sp. Porém, através de diferentes oligonucleotídeos o fungo foi identificado como pertencente a diferentes espécies, como *P. microspora* e *P. mangiferae* pela região ITS, *P. clavispora* e *Neopestalotiopsis egyptaca* para a região LSU, *P. paeoniicola, P. crassiuscula* e *Neopestalotiopsis egyptiaca* CPC26133 para o gene β-tubulina e *Neopestalotiopsis* sp. 11 AS.2015, *P. saprophhyta* MFLUCC 12-0282 e *P. clavispora* ZJXJ-PA1 pelo gene EF-1.

Tabela 4 - Identificação por análise comparativa da sequencia de rDNA do fungo *Pestalotiopsis* sp.

PRIMER	Identificação	Total	Query	E-value	ID*	Nº de acesso
ITS	*Pestalotiopsis microspora* CGJ-4	809	96%	0,0	94%	KT459350.1
	Pestalotiopsis mangiferae BCP143	809	96%	0,0	94%	KM510407.1
	Pestalotiopsis mangiferae BTN22	809	96%	0,0	94%	KM510401.1
LR	*Pestalotiopsis clavispora* 3.9120	547	93%	5e-152	96%	JN940829.1
	Neopestalotiopsis egyptiaca CPC26133	544	93%	7e-151	96%	KT950861.1
	Neopestalotiopsis egyptiaca CPC26132	544	93%	7e-151	96%	KT950860.1
β-Tubulina	*Pestalotiopsis paeoniicola*	832	98%	0,0	98%	FJ975603.1
	Pestalotiopsis crassiuscula HMG-TAZ	813	93%	0,0	99%	HM573247.1
	Neopestalotiopsis sp. LC6285	809	94%	0,0	98%	KX895346.1
Fator de elongação	*Neopestalotiopsis* sp. 11 AS.2015	483	98%	2e-132	96%	KR493650.1
	Pestalotiopsis saprophhyta MFLUCC 12-0282	477	98%	7e-131	95%	JX399048.1
	Pestalotiopsis clavispora ZJXJ-PA1	466	98%	2e-127	95%	KM402034.1

Tradicionalmente, a taxonomia do gênero *Pestalotiopsis* sp. era limitada a nomeação de espécies de acordo com o hospedeiro a partir do qual estes foram observados pela primeira vez e as morfologias conidiais, como a intensidade de cor da célula conidial mediana. Com a introdução da análise da sequência de DNA multi-lócus, o sistema tradicional de classificação baseado em hospedeiro e a divisão de grupos e espécies com base em caracteres conidiais provaram não ser confiáveis (LIU et al., 2016).

Estudos a partir da análise da região 28S rRNA (LSU) do genoma mostraram o gênero *Pestalotiopsis* sp. como pertencente a família Amphisphaeriaceae, constituindo um clado monofilético (JEEWON, 2003). Além disso, análises filogenéticas da região LSU realizadas através de Inferência Bayesiana (IB), Máxima Verossimelhança (VM) e Parsimonia Máxima (PM) indicaram que *Pestalotiopsis* compreende três principais clados monofiléticos. Espécies com morfologia semelhante às espécies tipo *Pestalotiopsis* (*P. maculans*) foram agrupadas em um clado designado como *Pestalotiopsis sensu strictu*. Dois clados foram agrupados fora de *Pestalotiopsis sensu strictu*, para o qual foram introduzidos dois novos gêneros, *Neopestalotiopsis* sp. e *Pseudopestalotiopsis* sp., sendo distintos geneticamente e em características intrínsecas de conídios e células conidiogênicas. Espécies contendo células conidiais com diferentes cores foram agrupadas no clado *Neopestalotiopsis*, enquanto o clado *Pseudopestalotiopsis* foi agrupado como um grupo irmão, constituindo espécies contendo células conidiais em cores homogêneas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; LIU et al., 2010).

Assim, baseado nas características morfológicas identificadas podemos concluir que o fungo em estudo pertence ao gênero *Pestalotiopsis* sp. Porém, os diferentes resultados obtidos a partir da análise molecular podem indicar que se trata de uma nova espécie pertencente ao gênero ainda não identificada, sendo necessários mais estudos acerca da morfologia e análises moleculares em outras regiões.

Espécies do gênero *Pestalotiopsis* sp. são patógenos de uma variedade de plantas, sendo comunmente isolados como endófitos ou ocorrendo como saprófitos (JEEWON et al., 2004) e podendo ser encontrados em ecossistemas tropicais e temperados. Os fungos endófitos são um intrigante grupo de espécies de fungos que colonizam tecidos vivos e saudáveis de plantas sem causar sintomas aparentes de doença. Sua habilidade em

produzir compostos bioativos naturais é considerada como fonte alternativa para compostos bioativos produzidos por plantas. Vários estudos demonstraram a capacidade dos fungos endófitos para produzir diversos compostos, tais como enzimas, substâncias antitumorais e hormônios de crescimento das plantas. O uso de fungos endófitos em vários processos industriais despertou o estudo desses microrganismos e levou à descoberta de novos compostos com potencial industrial e farmacêutico (BEZERRA et al., 2015; NETALA et al., 2016).

Além disso, o gênero tem recebido muita atenção da comunidade científica, devido não a sua natureza patogênica, mas devido a muitas espécies mostrarem-se produtoras de importantes metabólitos secundários (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011). Análises químicas mostram que *Pestalotiopsis* spp. são uma importante fonte para descobrimento de produtos naturais (como policetídeos, terpenoides e cumarinas) (WANG et al., 2012). Análises do transcriptoma da cepa *Pestalotiopsis* sp. NCi6 (ARFI et al., 2013) mostra um número de 400 enzimas lignocelulolíticas, com maior secreção de enzimas xilanases e celulases e menor produção de oxidases. Estudo do fungo marinho *Pestalotiopsis* sp. J63 (CHEN et al., 2011) mostra uma boa secreção da enzima lacase, em meio de cultura contendo bagaço de cana-de-açúcar ou palha de arroz.

Um fungo da espécie *Pestalotiopsis neglecta* foi obtido através de isolamento em amostras de *Cupressus torulosa.* Uma análise dos sobrenadantes testados contra patógenos apresentaram atividade antibiótica contra *Bacillus subtilis, Staphylococus aureus, Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium,* mostrando a maior zona de inibição 14,5 mm contra *S. aureus* e 15 mm contra *E. coli* respectivamente. A análise química foi realizada com extratos brutos fúngicos para determinar a presença de componentes químicos como fonte prospectiva de uso medicinal e industrial. Sua presença é um indicador que eles podem ser explorados como precursores no desenvolvimento e promoção de drogas sintéticas. Os metabolitos ativos contém grupos químicos tais como fenóis, flavonóides, terpenoides, alcalóides, taninos, carboidratos e saponinas (SHARMA et al., 2016).

Um estudo desenvolvido por Netala et al. (2016) mostra a biossíntese de nanopartículas de prata utilizando extrato extracelular do fungo *Pestalotiopsis microspora* isolada dos tecidos de folhas saudáveis de *Gymnema sylvestre*, uma

importante planta medicinal. As nanopartículas sintetizadas exibem atividades biológicas multifuncionais incluindo atividade antimicrobiana contra bactérias e patógenos fúngicos e atividade anticancerígena contra diferentes linhas celulares de câncer - B16F10 (melanoma de rato) SKOV3 (carcinoma de ovário humano), PC3 (carcinoma de próstata humana) e A549 (adenocarcinoma de pulmão humano).

A identificação do fungo selecionado no estudo, nos permite estabelecer que se trata de um organismo com grande potencial em biotecnologia, capaz de produzir importantes metabólitos secundários podendo ser utilizados como antimicrobianos, anticancerígenos, indutores de crescimento em plantas e enzimas utilizadas na indústria de lignocelulose, sendo ainda pouco estudado e caracterizado em relação a produção de enzimas oxidorredutases.

4.3 Produção e atividade de enzimas oxidorredutases e celulases

Para a determinação da atividade enzimática do fungo *Pestalotiopsis* sp. a massa micelial foi crescida em PDB durante 7 dias. Em seguida a massa micelial foi recuperada por centrifugação e inoculada meio Kirk onde o fungo foi cultivado durante 12 dias, sendo recolhidas alíquotas de 2 mL do sobrenadante no 2°, 4°, 6°, 8°, 10° e 12° dia de cultivo. Foram determinadas a quantidade de proteínas presentes na amostra e a atividade enzimática de oxidorredutases (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) (figura 10 A) e celulases (endoglucanase e exoglucanase) (Figura 10 B). Além disso, foram determinadas a quantidade de proteínas presentes na amostra e a atividade de celulases do fungo *T. reesei*, crescido em avicel 1%. Os dados foram expressos em atividade específica, que fornece a atividade de enzima por quantidade (mg) de proteína total no meio, expressa como μmol por miligrama de proteína (U/mg). A atividade enzimática (U/L), os valores de absorbância e o teor de proteína total para todos os ensaios são mostrados nos apêndices II, III, IV, V e VI.

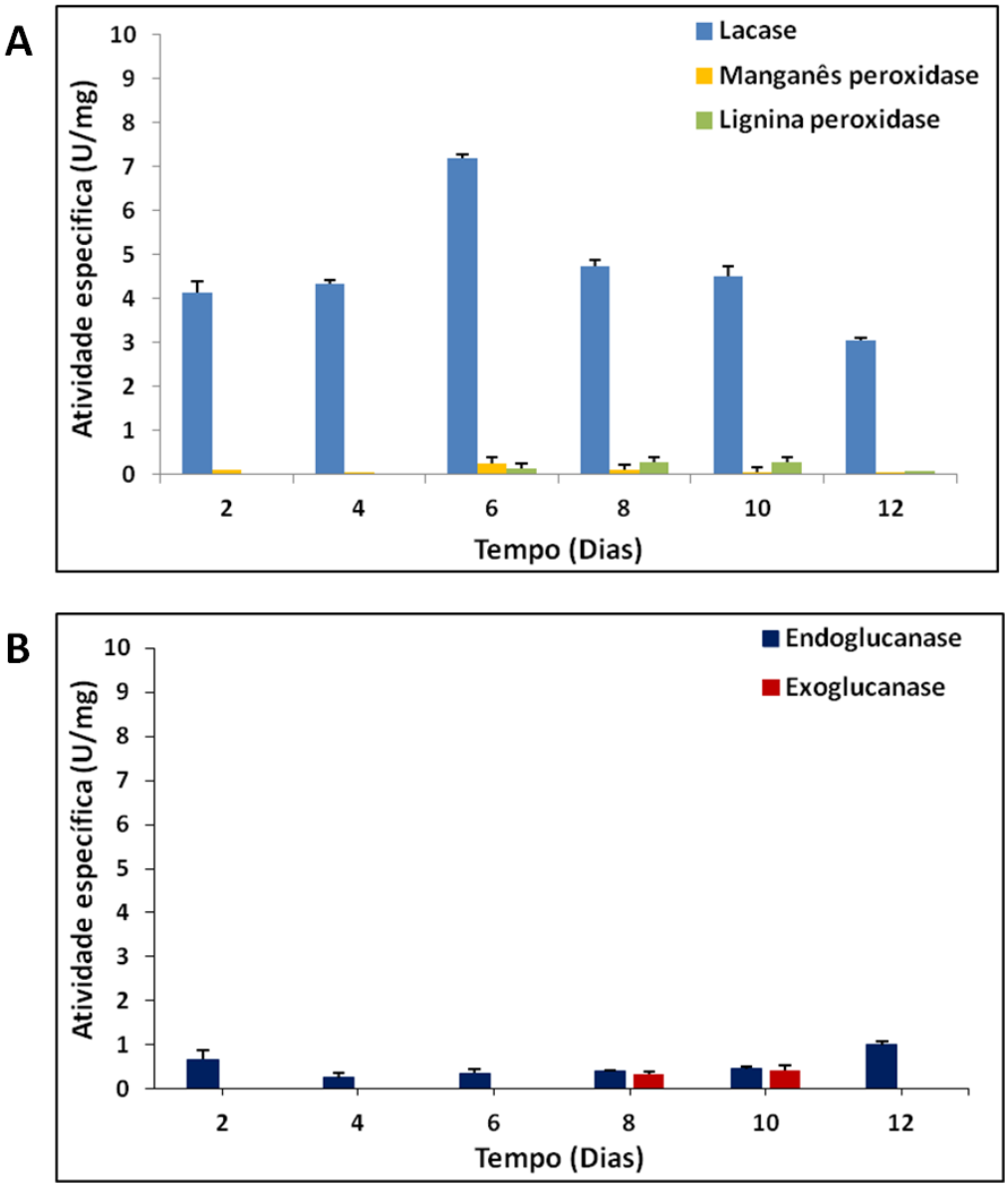


Figura 10 - Atividade específica de oxidorredutases (A) e celulases (B) do fungo *Pestalotiopsis* sp. O fungo foi cultivado durante 12 dias em meio Kirk contendo bagaço de cana-de-açúcar (0,5%) a 30 °C.

A figura 10A mostra que o fungo P*estalotiopsis* sp. apresentou maior atividade de lacase e menor atividade de manganês peroxidase e lignina peroxidase. A atividade de lacase apresentou-se alta já no 2° dia de cultivo (4,13 U/mg), ocorrendo um grande aumento do 4° ao 6° dia de cultivo (4,31 U/mg e 7,18 U/mg respectivamente). Após o 6° dia de cultivo ocorre uma diminuição da atividade de lacase, com o fungo apresentando 4,73 U/mg, 4,50 U/mg e 3,03 U/mg de atividade ao 8°, 10° e 12° dia de cultivo respectivamente.

Em fungos a regulação da produção de lacase está relacionada a uma série de compostos, como metais, compostos aromáticos e fontes de carbono e nitrogênio. Estudos envolvendo diversos fungos como *Trametes versicolor, Ceriporiopsis subvermispor, Pleurotus ostreatus, Coriolopsis rígida* entre outros mostram a indução da atividade de lacase relacionada a diversas concentrações de cobre no meio de cultura (PISCITELLI et al., 2011). No presente estudo, a adição de $CuSO_4$ (250 µM) no meio de cultura no 4° dia de cultivo foi capaz de aumentar consideravelmente a produção de lacase por *Pestalotiopsis* sp. Além disso, a presença de manganês no meio de cultura também pode estar relacionada com a regulação da atividade de lacase, porém a presença de manganês pode exercer efeitos antagônicos em diferentes espécies de fungos (MANUBENS et al., 2007).

Segundo Couto e Toca-Herrera (2007), fungos filamentosos são capazes de produzir lacases em grandes quantidades, no entanto, ainda falta um sistema de produção eficiente aplicável em escala industrial. Isso se deve principalmente ao fato de que a produção de lacase por cepas de tipo selvagem de fungos filamentosos está ligada ao metabolismo secundário, o que implica que as seguintes desvantagens devem ser superadas: crescimento fúngico não controlado, formação de polissacarídeos em torno do micélio e secreção de certos compostos (entre eles, proteases) que inativam lacases e outras enzimas lignolíticas.

A atividade de manganês peroxidase e lignina peroxidase mantiveram-se baixas ao longo dos 12 dias de cultivo, com manganês peroxidase apresentando 0,09 U/mg, 0,01 U/mg, 0,25 U/mg, 0,10 U/mg, 0,03 U/mg e 0,02 U/mg de atividade ao 2°, 4°, 6°, 8°, 10° e 12° dia de cultivo respectivamente. Lignina peroxidase apresentou atividade apenas a partir do 6° dia de cultivo, apresentando 0,12 U/mg, 0,26 U/mg, 0,25 U/mg e 0,07 U/mg. Os resultados mostram que a adição de veratril álcool (0.5 mM) ao 4° dia de cultivo induziu a atividade de ambas as enzimas, sendo que a cepa apresentou picos de atividade de manganês peroxidase e lignina peroxidase ao 6° e 8° dia de cultivo respectivamente.

O fungo *Pestalotiopsis* sp. apresentou maior atividade enzimática de lacase (7,18 U/mg), tendo apresentado valores comparáveis a alguns fungos basidiomicetos. O fungo *Marasmius quercophilus*, um importante basidiomiceto saprófito foi estudando quanto a produção de lacase, apresentando atividade máxima de 5,6 U/mg no sobrenadante bruto

(DEDEYAN et al., 2000). *Botrytis cinerea* foi caracterizado quanto a produção de lacase durante cultivo em meio líquido, apresentando atividade máxima de 9,08 U/mg (SLOMCZYNSKI et al., 1995). Um estudo feito com *Trametes pubescens* avaliou o efeito de diferentes condições de cultura em resíduos agro industriais. Quando cultivado em condições submersas com casca de café como substrato o fungo apresentou atividade de lacase de 7,69 U/mg de proteína no extrato bruto (GONZALEZ et al., 2013).

Estudos prévios envolvendo o gênero *Pestalotiopsis* sp. e a produção de enzimas lignolíticas não são muito documentados, embora haja algumas caracterizações na literatura quanto a produção de lacase. Hao et al. (2006) testou o efeito de várias fontes de carbono em uma cepa recém isolada sob cultivo em fermentação em estado líquido, onde glicose (20 g/L) e tartarato de amônia (10 g/L) foram os maiores indutores de lacase, apresentando atividade máxima de 32,7 U/mL. A cepa *Pestalotiopsis* sp. J63 foi estudada sob fermentação submersa e fermentação em estado sólido com vários subprodutos lignocelulósicos como substrato. Quando cultivado sob palha de arroz durante fermentação em estado sólido a cepa apresentou alta atividade de lacase (10700 U/g de substrato), enquanto que quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar durante fermentação submersa a cepa apresentou atividade máxima de 2000 U/mL (CHEN, 2011).

A cepa em estudo apresentou baixa atividade de manganês peroxidase e lignina peroxidase, havendo poucos registros na literatura quanto a produção de peroxidases lignolíticas. Uma cepa do gênero *Pestalotiopsis* sp. foi avaliada quanto a sua capacidade de decompor matéria orgânica, apresentando atividade máxima de manganês peroxidase de 0,15 U/ml (HAO et al., 2006). Além disso, não foram relatados estudos caracterizando o gênero *Pestalotiopsis* sp. quanto a produção de lignina peroxidase. A cepa em estudo só apresenta atividade enzimática de lignina peroxidase a partir do 6° dia de cultivo. A produção da enzima pela cepa pode estar relacionada à adição de veratril alcool (0,5) mM no meio de cultura ao 4° dia de cultivo. Em basidiomicetos este álcool desempenha papéis específicos como cofator fisiológico de lignina peroxidase, sendo um mediador redox entre LiP e degradação de lignina, e para a proteção da enzima durante o ciclo redox do H_2O_2 produzido metabolicamente. Porém, há poucas informações sobre seu papel em outros fungos de degradação de lignina como fungos ascomicetos, sendo necessários mais estudos (DEKKER et al., 2001).

A figura 10B mostra que o fungo *Pestalotiopsis* sp. apresenta baixa atividade de celulases, com a atividade de endoglucanase, com 0,67 U/mg, 0,26 U/mg, 0,36 U/mg, 0,40 U/mg, 0,46 U/mg e 1,00 U/mg de atividade ao 2°, 4°, 6°, 8°, 10° e 12° dia de cultivo respectivamente. Além disso a cepa apresentou atividade de exoglucanase apenas no 8° e 10° dia de cultivo, com 0,35 U/mg e 0,42 U/mg de atividade respectivamente.

Os resultados mostram uma relação inversa entre a atividade enzimática de oxidorredutases, que apresentam aumento da atividade ao longo do tempo e endoglucanase, que apresenta maior atividade no 2° dia de cultivo, decaindo a partir do 4° dia. Isso pode estar relacionado com a presença de compostos fenólicos e aromáticos resultantes da degradação da lignina, que podem inibir a atividade de enzimas celulolíticas (QIN et al., 2016) e aumentar a atividade de enzimas oxidativas. Apesar disso, o fungo apresenta um aumento da atividade no 12° dia, podendo estar relacionado a degradação da lignina pelas enzimas oxidativas e uma maior área de acesso às celulases. A indução de oxidorredutases por substâncias fenólicas pode representar uma resposta desenvolvida por fungos contra compostos aromáticos tóxicos. Ao catalisar a sua despolimerização, essas enzimas desempenham um papel defensivo, reduzindo o estresse oxidativo causado por radicais de oxigênio provenientes da reação dessas moléculas (PISCITELLI et al., 2011).

Para a determinação da atividade celulase de *T. reesei* (Figura 11) o fungo foi cultivado em meio mínimo sólido contendo sais ($FeSO_4$ 0,5%; $MnSO_4$ 0,16%; $ZnSO_4$ 0,16%; e $CaCl_2$ 0,2%) avicel 1% durante 5 dias, sendo os esporos suspensos em NaCl 0,9%. Em seguida a cultura foi crescida inoculando 2 mL (10^7 esporos por mL) de esporos em PDB, sendo o meio deixado em agitação a 150 rpm a 30° C durante 5 dias. A massa micelial foi recuperada por centrifugação e inoculada em meio de cultura mínimo e deixado em agitação durante 10 dias. Alíquotas foram retiradas do meio de cultura no 2°, 3°, 4°, 6°, 8° e 10° dia de cultivo e utilizado nos ensaios enzimáticos.

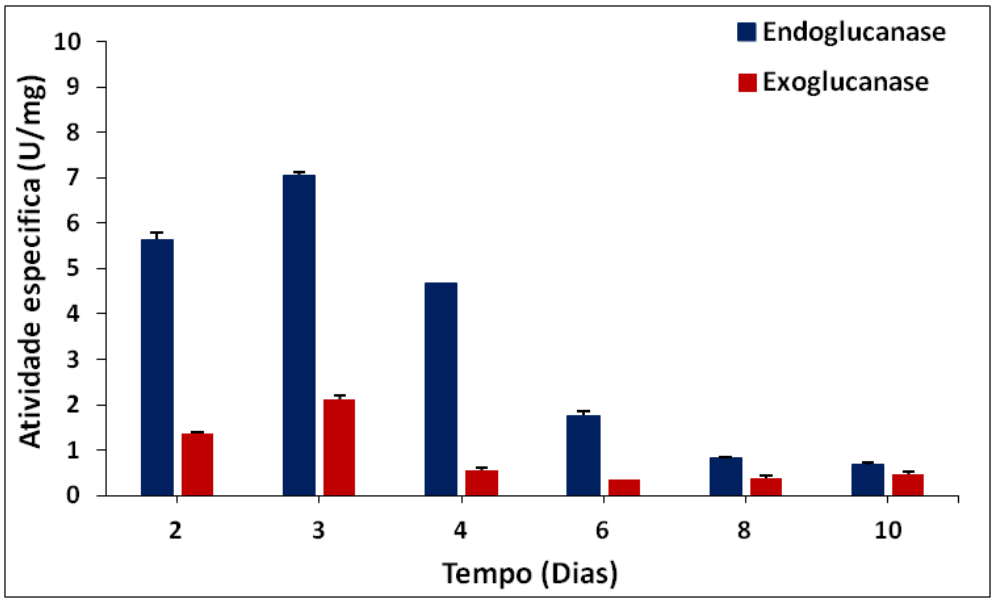


Figura 11 - Atividade específica de celulases do fungo *T. reesei* QM9414. O fungo foi cultivado em meio mínimo com avicel 1% a 30 °C durante 10 dias.

O fungo *T. reesei* apresentou alta atividade de celulases, com a atividade enzimática de endoglucanase e exoglucanase, com 5,63 U/mg, 7,05 U/mg, 4,67 U/mg, 1,76 U/mg, 0,81 U/mg e 0,67 U/mg de atividade endoglucanase e 1,36 U/mg, 2,11 U/mg, 0,55 U/mg, 0,34 U/mg, 0,38 U/mg e 0,45 U/mg ao 2°, 3°, 4°, 6°, 8° e 10° dia de cultivo respectivamente. Foi constatada uma queda na atividade enzimática a partir do 4° dia de cultivo, com endoglucanase e exoglucanase terminando com menor atividade ao 10° dia de cultivo

Além disso, foi constatado que o fungo *Pestalotiopsis* sp. apresentou baixa atividade de celulases quando comparado ao fungo *T. reesei*, com ambos os fungos apresentando atividade máxima de endoglucanase de 1,00 U/mg e 7,05 U/mg durante o 12° e 3° dia de cultivo respectivamente e atividade máxima de exoglucanase de 0,42 U/mg e 2,11 U/mg durante o 8° e 3° dia de cultivo respectivamente.

Os dados obtidos nessa etapa do estudo mostraram que os fungos *Pestalotiopsis* sp. e *T. reesei* atingem seus picos de atividade enzimática no 8° e 3° dia de cultivo respectivamente. Desse modo, para a etapa de montagem dos coquetéis enzimáticos e sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar as culturas dos fungos foram filtradas ao 8° e 3° dia de cultivo respectivamente.

4.4 Purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica

Com o objetivo de purificar as diferentes enzimas estudadas e avaliação de seu papel durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, o sobrenadante bruto do fungo *Pestalotiopsis* sp. foi purificado utilizando cromatografia por troca iônica. 35 mL do sobrenadante foi recuperado e filtrado ao 8° dia de cultivo e purificado através de uma coluna Q-sepharose. Foram coletadas as frações que apresentavam picos de proteína e determinada a atividade enzimática de enzimas oxidorredutases e celulases. O perfil cromatográfico do sobrenadante obtido em estudo é mostrado na figura 12.

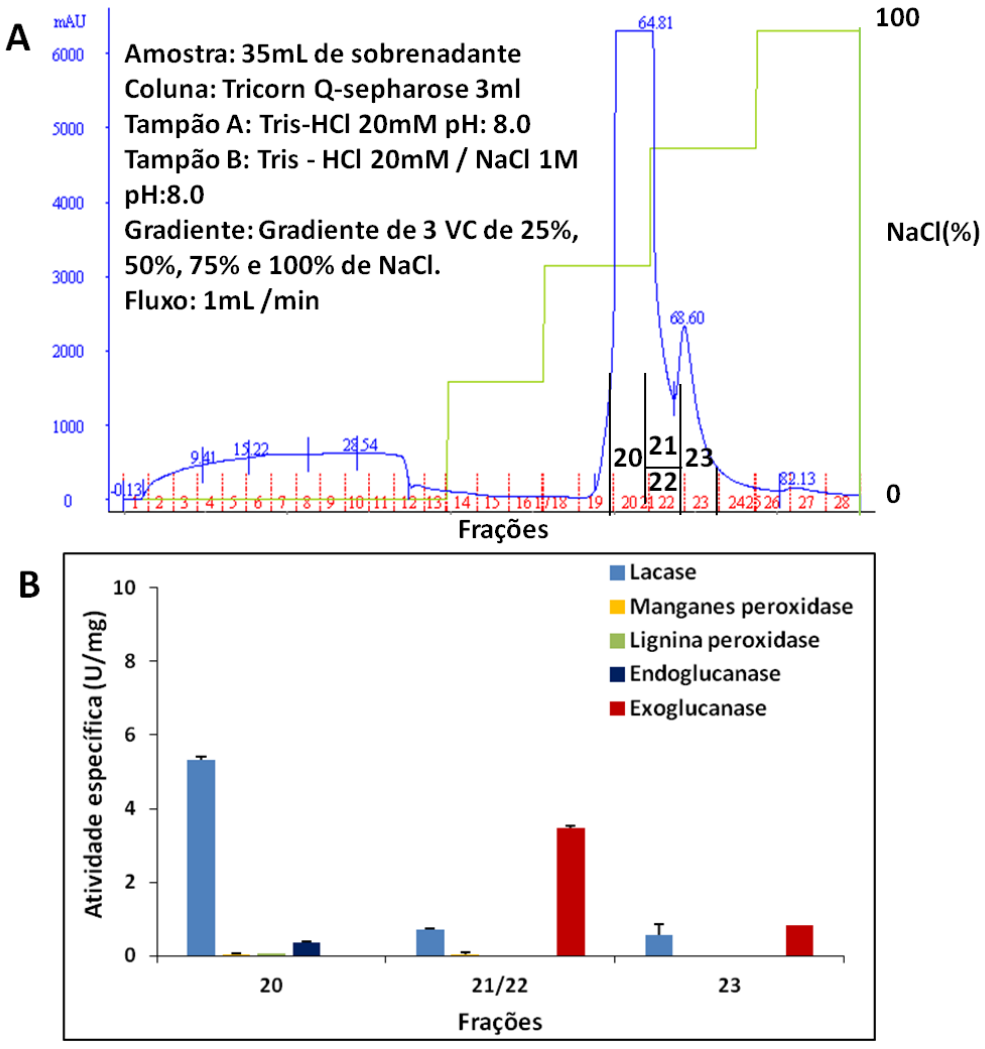


Figura 12 - Determinação e purificação de enzimas produzidas pelo fungo *Pestalotiopsis* sp. Perfil de cromatografia de purificação de proteínas presente no sobrenadante do meio de cultura (A); determinação de atividade de enzimas presente nas frações coletadas na figura 10A (B). O fungo foi crescido em meio kirk contendo bagaço de cana-de-açúcar (0,5%) a 30 °C.

A atividade de lacase foi determinada nas frações 20 (5,65 U/mg) 21/22 (0,71 U/mg) e 23 (0,57 U/mg). A atividade de manganês peroxidase foi determinada na fração 20 (0,04 U/mg) e 21/22 (0,04 U/mg). A atividade de lignina peroxidase foi determinada na fração 20 (0,05 U/mg). Também foi identificada atividade de endoglucanase na fração 20 (0,36 U/mg) e exoglucanase na fração 21/22 (3,47 U/mg) e 23 (0,84 U/mg). Não foi observada atividade enzimática nas frações 19 e 24.

Nas amostras purificadas da cepa em estudo, foi observado que há atividade enzimática de lacase nas 3 frações coletadas, enquanto manganês peroxidase se concentra em duas frações e lignina peroxidase se concentram em apenas uma fração. Observou-se também que tanto manganês peroxidase quanto lignina peroxidase se concentram em frações onde ocorrem os maiores picos de proteínas, enquanto lacase e exoglucanases foram encontradas na fração 23, onde ocorre um menor pico de proteína. Por outro lado, embora o fungo *Pestalotiopsis* sp. também tenha apresentado atividade enzimática em mais de uma fração, todas as proteínas foram eluidas em 50% de NaCl 1 M.

As amostras que apresentaram os maiores picos de atividade oxidorredutase foram separadas em gel SDS-PAGE e PAGE nativo para a observação da atividade enzimática. As amostras em gel SDS-PAGE (Figura 13A) foram corridas durante 180 minutos em voltagem de 80 V à temperatura ambiente. As amostras em PAGE-nativo foram corridas durante 20 horas em voltagem de 50 V a 4 °C. Após a lavagem, o gel foi incubado em ABTS a 37 °C ao abrigo da luz e aguardado o período da reação. As bandas que apresentaram atividade enzimática são mostradas na figura 13B.

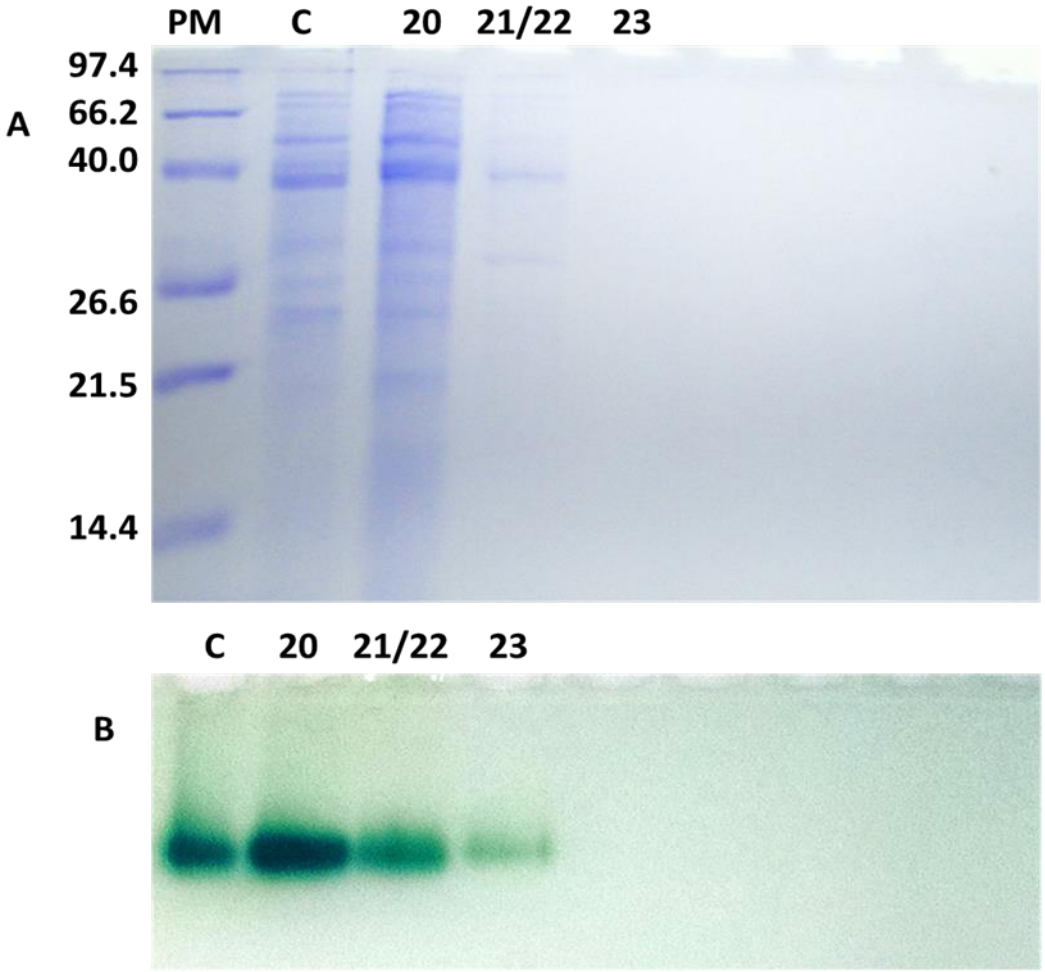


Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%). Amostras da purificação do sobrenadante da cepa BBF245 que foram obtidas de cultura em meio kirk (A). Amostras separadas em SDS-Page. O gel foi corado com coomassie blue durante 180 minutos e descorado durante 16 horas. (B). Amostras separadas em Page nativo sob condições não desnaturantes. O gel foi corado com ABTS 2 mM durante 60 minutos a 37 °C. Os números 20, 21/22 e 23 correspondem às frações obtidas na etapa de purificação. PM = marcador de peso molecular (Protein MW maker, mid-low range (J450, Amresco). C = Controle (Sobrenadante bruto).

O perfil enzimático obtido no presente estudo pode fornecer informações sobre o comportamento das três enzimas oxidorredutases estudadas, embora mais estudos sejam necessários.

As frações obtidas após a purificação foram utilizadas em ensaios de sacarificação com bagaço de cana-de-açúcar, porém o coquetel enzimático produzido a partir das frações purificadas não apresentou aumento significativo em relação à amostra controle (tabela 5). Isso pode ser devido a uma possível perda de atividade enzimática após a

purificação. Além disso, o baixo volume recuperado após a purificação pode contribuir para um aumento de custo do processo, onde podem ser necessárias muitas etapas de purificação para obter maiores volumes de enzimas.

Um dos maiores desafios na produção de etanol a partir de biomassa é o alto custo na produção de enzimas, o que pode deixar o processo pouco competitivo no mercado. Desse modo devem ser encontradas alternativas para a obtenção de maiores volumes de enzimas e diminuição de custos, como a produção de proteínas heterólogas em vetores de alta expressão, produção integrada de enzimas lignocelulolíticas e a obtenção de extratos brutos (JOHNSON, 2016).

Desse modo, para a continuação do estudo e produção do coquetel enzimático optou-se pela utilização dos sobrenadantes brutos, com o objetivo de diminuição dos custos e obtenção de maiores volumes de enzimas.

4.5 Ensaios de sacarificação do bagaço de cana de açúcar

Para os ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados sobrenadantes obtidos de diferentes culturas provenientes de *T. reesei* e *Pestalotiopsis* sp. Foram realizados 5 ensaios diferentes, onde foram testadas diferentes condições como: diferentes sobrenadantes, cultivo das culturas, diferentes proporções entre as misturas enzimáticas e volume final da reação. As diferentes condições utilizadas em todos os ensaios são mostradas na tabela 5.

Para a montagem dos ensaios foram utilizadas duas amostras: 1- um controle contendo apenas enzimas celulases de *T. reesei* e 2 - Um coquetel de enzimas contendo celulases de *T.reesei* e enzimas oxidorredutases do fungo *Pestalotiopsis* sp. Para a preparação do coquetel enzimático no primeiro ensaio realizado foram utilizados uma solução estoque proveniente de *T. reesei* (8,5 mL) e o sobrenadante obtido de *Pestalotiopsis* sp. através de purificação por cromatografia de troca iônica (2 mL), com volume final de 12,5 mL para 1g de bagaço de cana-de-açúcar. A amostra controle e o coquetel enzimático geraram 5,28 g/L e 5,85 g/L de açúcares redutores respectivamente. Devido ao baixo volume de sobrenadante recuperado após a purificação, para a preparação do coquetel enzimático nos ensaios posteriores foram utilizados os sobrenadantes brutos. Os ensaios 2 e 3 foram realizados em um volume final de 20 mL

na proporção *T. reesei* 8 mL / *Pestalotiopsis* sp 6 mL e os ensaios 4 e 5 foram realizados em um volume final de 25 mL na proporção *T. reesei* 10 mL / *Pestalotiopsis* sp. 10 mL Nesses ensaios foi constatado uma baixa geração de açúcares, sendo a maior quantidade de açúcares produzidas pelo coquetel enzimático no 4° ensaio (2,54 g/L), provavelmente devido a baixa atividade de celulases no sobrenadante de *T. reesei*. Assim, para induzir a atividade de celulases em *T. reesei* o fungo foi cultivado em meio mínimo sólido suplementado com avicel 1,5%, onde foram obtidos os esporos ao 5° dia de cultivo.

Tabela 5 - Condições de cultura e açúcares obtidos em diferentes ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio	sobrenadantes	Mistura enzimática	Substrato	Volume Final	Açúcares redutores (controle)	Açúcares redutores (Coquetel enzimático)
1	*Trichoderma* (stock 2010) + Purificação *Pestalotiopsis* sp.	*Trichoderma* 8,5 mL + *Pestalotiopsis* sp. 2 mL	Bagaço de cana-de-açúcar (1g)	12,5 mL	5,28g/L	5,85 g/L
2	*Trichoderma* (esporos PDA) + *Pestalotiopsis* sp. (Sob. Bruto)	*Trichoderma* 8 mL + *Pestalotiopsis* sp. 6 mL	Bagaço de cana-de-açúcar (1g)	20 mL	1,92g/L	1,73 g/L
3	*Trichoderma* (esporos PDA) + *Pestalotiopsis* sp. (Sob. Bruto)	*Trichoderma* 8 mL + *Pestalotiopsis* sp. 6 mL	Bagaço de cana-de-açúcar (1g)	20 mL	1,52g/L	2,24 g/L
4	*Trichoderma* (esporos PDA) + *Pestalotiopsis* sp. (Sob. Bruto)	*Trichoderma* 10 mL + *Pestalotiopsis* sp. 10 mL	Bagaço de cana-de-açúcar (1g)	25 mL	1,6g/L	2,54 g/L
Final	*Trichoderma* (esporos avicel (1,5%) + *Pestalotiopsis* sp. (Sob. Bruto)	*Trichoderma* 10mL + *Pestalotiopsis* sp. 10mL	Bagaço de cana-de-açúcar (1g)	25 mL	12,29g/L	15,52 g/L

Para a realização do ensaio final, os fungos *Pestalotiopsis* sp. e *Trichoderma reesei* foram cultivados em 200 mL de PDA e PDB durante 7 e 5 dias respectivamente. Em seguida a massa micelial dos fungos foi obtida e cultivada em 500 mL de meio kirk com bagaço de cana de açúcar (0,5%) e 500 mL meio mínimo com avicel (1%) respectivamente, sendo os meios de cultura filtrados no 8° e 3° dia de cultivo respectivamente. Para a montagem das misturas enzimáticas a serem usadas nos ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar 500 mL de ambos os sobrenadantes foram concentrados por ultrafiltração até o volume de 100 mL e conservados a 5 °C. Os sobrenadantes de *Pestalotiopsis* sp. e *T. reesei* foram submetidos a ensaios de atividade enzimática ao 2°, 8° dia de cultivo e 2° e 3° dia de cultivo respectivamente e após terem sido concentrados, foram quantificadas a atividade de oxidorredutases e celulases. Os resultados obtidos são mostrados na figura 14 e na tabela 6.

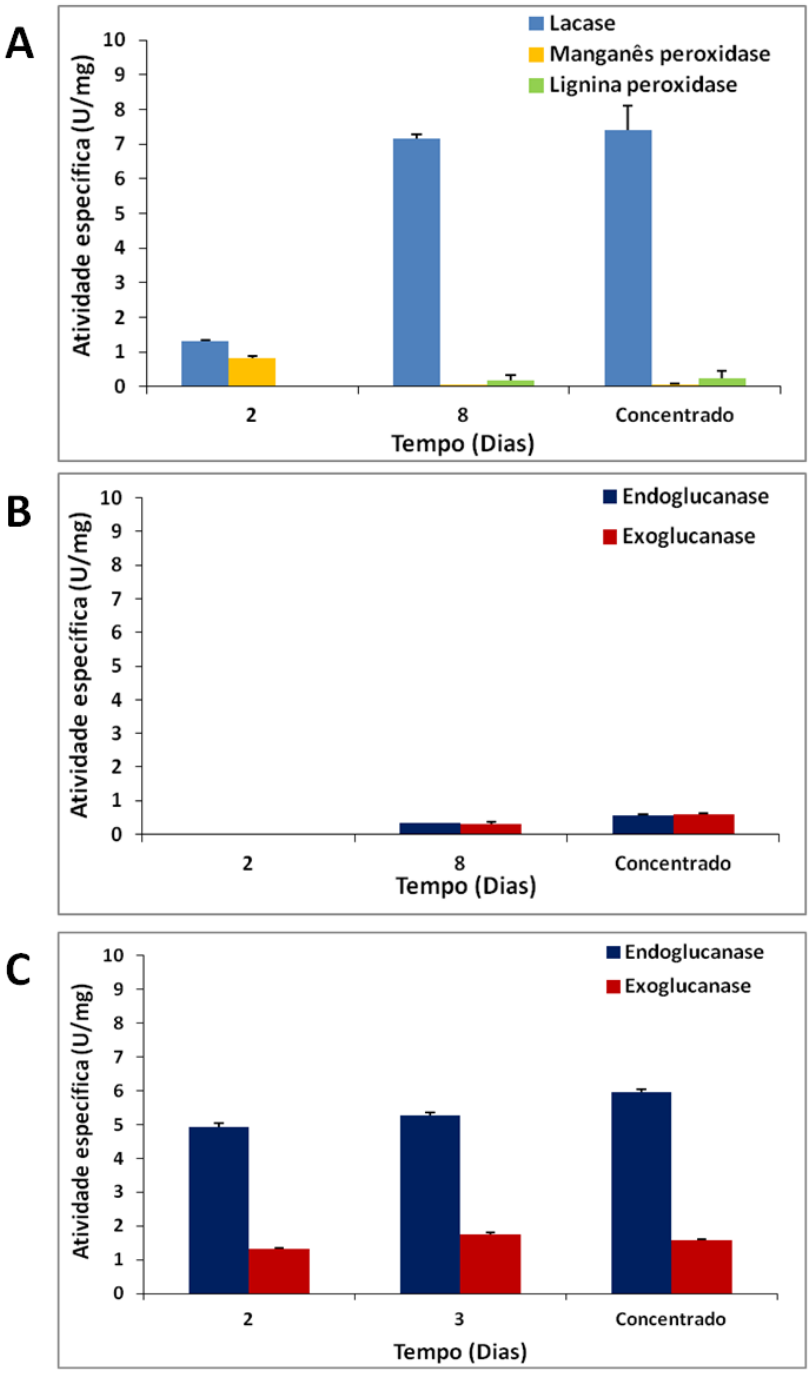


Figura 14 - Atividade específica de enzimas oxidorredutases (A) e celulases (B) do fungo *Pestalotiopsis* sp. durante cultivo em bagaço de cana-de-açúcar e celulases de *T. reesei* (C) durante cultivo em avicel 1%. Concentrado= sobrenadante bruto concentrado 5x por ultrafiltração.

Tabela 6 - Atividade específica de enzimas presentes nos sobrenadantes provenientes dos fungos *T. reesei* e *Pestalotiopsis* sp., a serem utilizados na preparação do coquetel enzimático para o ensaio final de sacarificação do bagaço de cana de açúcar.

Enzima	***T. reesei***	***Pestalotiopsis sp.***
Lacase	-	7,41 U/mg
Manganês peroxidase	-	0,04 U/mg
Lignina peroxidase	-	0,25 U/mg
Endoglucanase	4,91 U/mg	0,55 U/mg
Exoglucanase	1,57 U/mg	0,58 U/mg

Na preparação da amostra controle foram utilizados 10 mL do sobrenadante de *T. reesei* (250 µg de proteínas totais), 12,5 mL de H_2O destilada e 2,5 mL de tampão citrato 0.5 M, pH: 4.8. Para a preparação do coquetel foram utilizadas 10 mL do sobrenadante de *T. reesei* (250 µg de proteínas totais), 10 mL do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp. (670,37 µg de proteínas totais), 2,5 mL de H_2O destilada e 2,5 mL de de tampão citrato 0.5 M, pH 4.8.

Após a incubação do bagaço de cana-de-açúcar com a mistura de enzimas alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 2, 4, 6 e 24 horas e determinada a quantidade de açúcares redutores liberados e a atividade enzimática de celulases e oxidorredutases. Os açúcares redutores liberados e a atividade enzimática de celulases e oxidorredutases estão mostrados nas figuras 15 e 16.

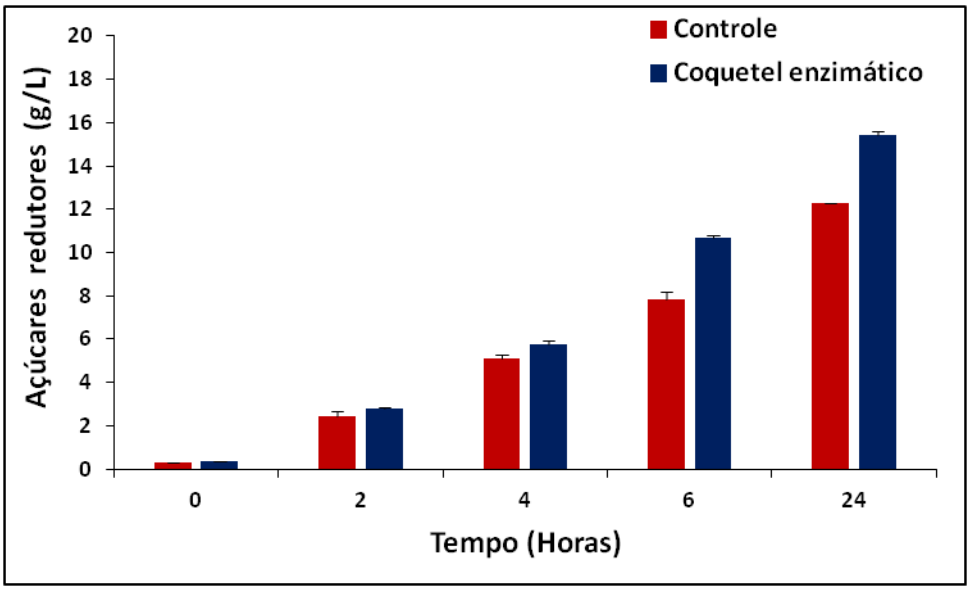


Figura 15 - Açúcares redutores liberados durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Controle (enzimas de *T. reesei*). Coquetel enzimático (enzimas de *T. reesei* + enzimas de *Pestalotiopsis* sp). As amostras foram incubadas durante 24 horas a 50 °C. Açucares redutores foram determinados pela metodologia de DNS (Ghose, 1987).

Na amostra controle foram liberados 0,33 g/L; 2,61 g/L; 5,23 g/L; 8,09 g/L e 12,29 g/L de açúcares redutores após 0, 2, 4, 6 e 24 horas de reação respectivamente. No coquetel enzimático foram liberados 0,36 g/L; 2,86 g/L; 5,88 g/L; 10,76 g/L e 15,52 g/L de açúcares redutores durante 0, 2 ,4 ,6 e 24 horas de reação respectivamente.

A tabela 7 mostra diferentes ensaios montados a partir de amostras de diferentes fungos. Constatou-se que o coquetel foi capaz de liberar mais açúcares que a amostra controle, uma vez que em 24 horas a amostra controle e o coquetel foram capazes de liberar 12,29 g/L e 15,52 g/L de açúcares redutores respectivamente. Além disso, foi constatado que a maior parte dos açúcares provenientes da reação foram liberados nas primeiras 6 horas da reação, com a amostra controle e o coquetel liberando 8,09 g/L e 10,76 g/L respectivamente, representando 70% e 68% do total de açúcares respectivamente.

Tabela 7 - Ensaios de sacarificação e misturas enzimáticas utilizadas em diferentes condições e diferentes substratos.

Amostras	**Mistura enzimática**	**Substrato**	**Volume final**	**Açúcares redutores**	**Referência**
Trichoderma viride	Complexo celulolítico de *T. viride*	Espiga de milho (5g)	75 mL	5,2 g/L (24 h)	SARTORI et al., 2015
Aspergillus niger	Complexo celulolítico	Serragem (4g) (Pré-tratado com aquecimento 90° e NaOH 2%	40 mL	2,88 g/L (48 h)	KIM et al., 2012
Myceliophthora thermophila	FPase e B-glicosidase	Bagaço de cana-de-açúcar ozonizado	ND	10,19 g/L (8 h)	PEREIRA et al., 2015
T. reesei	Celobiohidrolases e endoglucanases	palha de cevada (Pré-tratamento com explosão a vapor	ND	3,8 g/L (24 h)	MEYER et al., 2009
T. reesei YH18	Celulases (FPU) e xilanase (2:8)	Palha de milho	50mL	162,71 g/L (108 h)	LI et al., 2017
T. reesei QM9411	Endoglucanase e exoglucanase	Bagaço de cana-de-açúcar (4%)	25mL	12,29 g/l (24 h)	O estudo
T. reesei QM9411 e *Pestalotiopsis* sp.	Endoglucanase, exoglucanase, lacase e peroxidases	Bagaço de cana-de-açúcar (4%)	25mL	15,52 g/L (24 h)	O estudo

*ND = Não determinado

Sartori et al. (2015) testou a viabilidade de substratos lignocelulósicos para obter açúcares redutores, através da caracterização de enzimas celulases, que foram obtidas por fermentação em estado sólido utilizando *Trichoderma viride*. Além disso, foi utilizado um coquetel composto por celulases comerciais. O comportamento do complexo celulolítico produzido por *T. viride* foi semelhante em todos os substratos estudados durante o período de sacarificação. Por outro lado, verificou-se que a enzima comercial tem diferentes graus de especificidade entre os substratos, enquanto que o complexo celulolítico não apresentou diferença de especificidade entre os substratos.

Utilizando espiga de milho como substrato e enzimas produzidas por *T. viride* foi obtido a maior quantidade de açucares redutores liberados após 24 horas de incubação, liberando 5 g/L a 40 °C e pH 4.4. Além disso foi constatado uma influência direta de fatores como temperatura e pH, tendo a amostra liberado apenas 4 g/L a 50 °C e pH 4.8, e apenas 2,5 g/L a 60 °C e pH 5.2.

Outro estudo realizado por Kim et al. (2012) avaliou o efeito do pré-tratamento físico-químico de serragem através de incubação a 90 °C e lavagem com NaOH 2%, seguido de hidrólise enzimática por celulases obtidas de *Aspergillus niger*, obtendo 3,42 g/L de glicose após 48 horas de hidrólise.

Utilizando bagaço de cana-de-açúcar ozonizado Pereira et al., (2015) avaliou a liberação de açúcares após 24 horas utilizando as enzimas FPase e β-glicosidase provenientes de *Myceliophthora thermophila.* Após 8 horas de hidrólise a 60 °C, foram obtidos 10,19 g/L de glicose a partir de 10% de bagaço de cana-de-açúcar ozonizado. Além disso, foi constatada relação inversamente proporcional entre a quantidade de matéria seca presente na reação e a eficiência na sacarificação, com a maior proporção de glicose liberada em amostras com menor concentração de matéria seca (30% de sacarificação em 3% de matéria seca contra 5% de sacarificação em 10% de matéria seca).

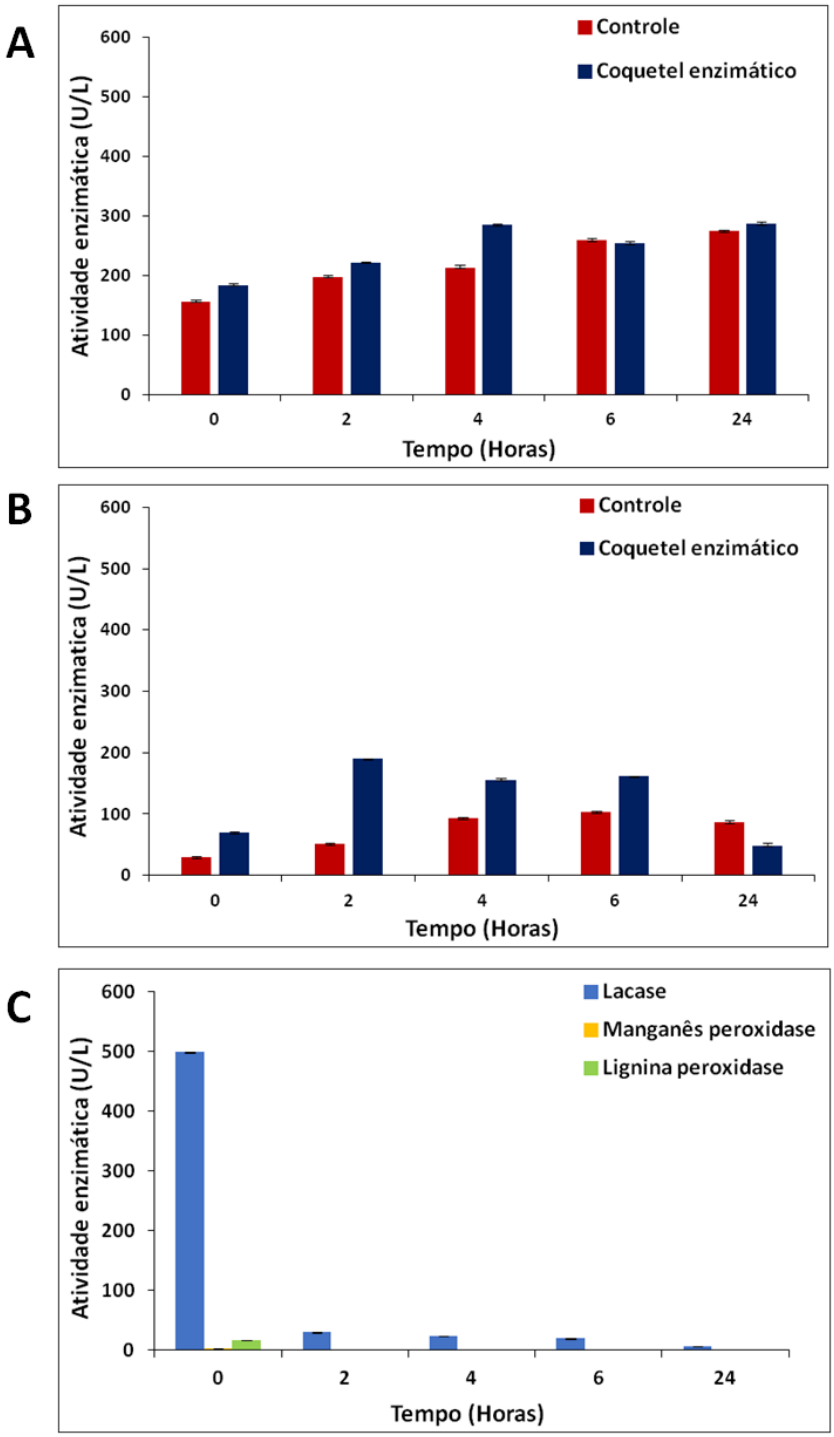


Figura 16 - Atividade enzimática de celulases e oxidorredutases durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. (A): Atividade de endoglucanase. (B): Atividade de exoglucanase. (C): Atividade de oxidorredutases do coquetel enzimático. Controle (enzimas de *T. reesei*). Coquetel enzimático (enzimas de *T. reesei* + enzimas de *Pestalotiopsis* sp.). As amostras foram incubadas a 50 °C durante 24 horas.

A figura 16 mostra a atividade enzimática de celulases e oxidorredutases durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Na amostra controle foi observado atividade endoglucanase de 157,16 U/L, 196,74 U/L, 213,70 U/L, 261,19 U/L e 274,76 U/L após 0, 2, 4, 6 e 24 horas respectivamente. No coquetel enzimático foi observado maior atividade de endoglucanase, com a amostra apresentando 185,43 U/L, 220,48 U/L, 283,80 U/L, 254,41 U/L e 288,33 U/L após 0, 2, 4, 6 e 24 horas respectivamente.

Na amostra controle foi observado atividade exoglucanase de 29,39 U/L, 49,75 U/L, 93,84 U/L, 102,89 U/L, 87,06 U/L após 0, 2, 4, 6 e 24 de reação respectivamente. No coquetel enzimático foi observado maior atividade de exoglucanase, com a amostra apresentando 71,23 U/L, 187,69 U/L, 154,90 U/L, 162,82 U/L e 47,49 U/L após 0, 2, 4, 6 e 24 horas respectivamente.

Esses resultados diferem dos dados obtidos por Sartori et al. (2015), onde verificou-se que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas em tempos iniciais de sacarificação, independentemente da fonte de enzima utilizada (complexo celulolítico ou celulase comercial). Observou-se uma alta diminuição na atividade enzimática até 12 horas de reação, com estabilização posterior. Além disso, até 12 horas de sacarificação, a formação de açúcares redutores mostrou aumento gradual, permanecendo estável após esse período. Isso pode ser explicado pela desnaturação térmica das enzimas e também pela influência da concentração do substrato na atividade enzimática (SARTORI et al., 2015).

Utilizando palha de cevada, Meyer et al. (2009) testou o papel de diferentes grupos de celobiohidrolases (CBH I e CBH II) e endoglucanases (EG I e EG II) provenientes de *T. reesei* através de diferentes proporções e combinações entre as enzimas estudadas, obtendo após 24 horas 3,8 g/L de glicose após um pré-tratamento em explosão a vapor e utilizando a proporção de CBH I (46%), CBH II (27%) e EG I (27%). Além disso, foi constatado que as proporções ótimas e o papel de cada enzima podem variar de acordo com o pré-tratamento utilizado. Quando a palha de cevada foi submetida a um pré-tratamento com água fervida foi constatado que as proporções ótimas das enzimas estudadas mudaram para CBH I (43%), CBH II (20%) e EG I (37%) e obtendo 2,3 g/L de glicose após 24 h. Esses resultados mostram que são necessários mais estudos acerca das proporções ideais de enzimas e sua relação com diferentes pré-tratamentos e substratos.

A figura 16C mostra a atividade enzimática de oxidorredutases durante a sacarificação. O coquetel apresentou atividade lacase de 308,33 U/L, 30 U/L, 23,95 U/L, 19,09 U/L e 6,25 U/L após 0, 2, 4, 6 e 24 horas respectivamente. Só foi observada atividade de manganês peroxidase e lignina peroxidase na hora inicial da reação, com a amostra apresentando 3,09 U/L e 17,2 U/L respectivamente.

Estudos sobre a utilização de enzimas oxidativas como complemento no processo de hidrólise enzimática da lignocelulose ainda são escassos, estando essa linha de pesquisa ainda em desenvolvimento. Os polímeros de lignina são o principal obstáculo para a utilização eficiente de materiais lignocelulósicos. Consequentemente, uma delignificação preferencial melhoraria o desempenho do processo porque facilitaria o acesso de enzimas hidrolíticas a polissacarídeos, mantendo ao mesmo tempo um bom nível de açúcares fermentáveis (SALVACHUA et al., 2011) No geral, enzimas oxidativas lignolíticas são utilizadas durante a fase de pré-tratamento da biomassa com o objetivo de despolimerização da lignina e remoção de compostos fenólicos gerados como resíduos, seguido da subsequente etapa de sacarificação apenas com enzimas hidrolíticas (WANG et al., 2013).

Recentemente, uma nova enzima tipo lacase (Tfu1114) foi caracterizada no modelo de bactéria celulolítica *Thermobifida fusca*. Foi demonstrado que Tfu1114 pode aumentar significativamente a hidrólise dos polissacarídeos do bagaço quando combinada com uma celulase ou uma xilanase do mesmo organismo (CHEN et al., 2013). Além disso, Woolridge (2013) demonstrou que sistemas mistos de enzimas hidrolíticas e oxidativas podem ser combinados com a finalidade de aumentar a eficiência na liberação de açúcares durante o processo de sacarificação.

Ji et al. (2014) produziu um coquetel enzimático a partir do sobrenadante bruto de *Cladosporium cladosporioides*, contendo alta atividade de Lacase e peroxidase independente de manganês (MiP), além de polissacarídeo hidrólases e hemicelulases. O coquetel enzimático foi produzido em complemento a enzimas xilanases comerciais, liberando uma quantidade significativamente maior de açúcares redutores (10,9 mg/mL) em comparação a amostra controle composta de xilanases e celulases comerciais (7,8 mg/mL) após 120 horas, indicando que o extrato bruto contendo lacase e peroxidase independente de manganês foi capaz de aumentar a hidrólise da biomassa em

complemento a enzimas hidrolíticas comerciais, mostrando que coquetéis enzimáticos compostos por enzimas lignolíticas podem ser usados em complemento a xilanases comerciais, podendo ser um substituto mais barato e eficiente em relação a misturas de celulases comerciais (JI et al., 2014).

No ensaio final a amostra controle foi capaz de produzir alta quantidade de açúcares redutores. Além disso, foi demonstrado que adicionando o sobrenadante bruto de *Pestalotiopsis* sp. com alta atividade de lacase foi capaz de aumentar a liberação de açúcares redutores. No coquetel as enzimas exoglucanases e endoglucanases apresentam um maior tempo de atividade em relação ao controle, podendo estar relacionado a ação da lacase e das outras enzimas oxidativas sobre a lignina, criando mais locais de clivagem na estrutura de rede do complexo de lignina-carboidrato e consequentemente expondo mais fibras de polissacarídeos às enzimas hidrolíticas. Porém, embora tenha sido constatado um aumento na quantidade de açúcares liberados quando combinadas enzimas celulases e oxidorredutases de *T. reesei* e *Pestalotiopsis* sp., foi constatado uma perda na atividade de oxidorredutases durante a reação.

Berrin et al. (2014) identificou o secretoma de diversos fungos isolados e avaliou a capacidade dessas cepas de fungos para potencializar um coquetel comercial de celulases de *Trichoderma reesei* CL847 para a liberação de açúcares solúveis a partir da biomassa. Dos 74 fungos identificados e testados neste estudo, foram identificados tanto ascomicetos quanto cepas de basidiomicetos que melhoraram significativamente a conversão de açúcares em combinação com a referência *T. reesei* CL847. Porém, constatou-se que as cepas que mais produziram açúcares quando foram testadas sozinhas (*Ganoderma* sp BRFM 1030, *Artolenzites elegans* BRFM 1122 e *Hypocrea lixii* BRFM 1285) não foram os de melhor desempenho quando testados em combinação com o coquetel enzimático de *T. reesei*. Isso sugere que nesses organismos suas estratégias enzimáticas para desconstruir a lignocelulose foram semelhantes a *T. reesei*. Além disso, constatou que as cepas que tiveram o melhor desempenho em associação ao coquetel de *T. reesei* foram fungos da podridão branca, como *Daedaleopsis* sp., *Phellinus* sp., *Pycnoporus* sp. E *Trametes* sp., sendo relatados como fungos que mineralizam os componentes da parede celular e extensivamente degradam lignina, sendo grandes produtores de lacase, enquanto *T. reesei* degrada preferencialmente celulose. Isso indica que a melhor estratégia para a montagem de coquetéis enzimáticos seria combinar

organismos que possuam diferentes características quanto à degradação de lignocelulose e que produzam diferentes classes de enzimas.

Alguns estudos identificaram diferentes características quanto a degradação de biomassa entre diferentes fungos. Benoit et al. (2015), avaliou diferentes espécies do gênero *Aspergillus* sp. quanto a misturas de enzimas secretadas durante a degradação de diferentes fontes de biomassa e sua relação com os genes presentes em cada cepa. Apesar da semelhança filogenética entre as espécies, constatou-se diferentes estratégias utilizadas por cada fungo em diferentes substratos para a degradação da biomassa vegetal. Quando comparada as semelhanças entre os genes presentes em cada espécie a porcentagem de genes idênticos para glicosídeo hidrólases (GH) foi de 58% a 66% entre todas as espécies, porém quando comparadas em relação a famílias individuais de enzimas ativas sobre carboidratos (*Carbohydrate-Active enzymes database* - CAZy) diferenças significativas nos números de genes foram observados, onde apenas 14,7% dos genes que codificam as enzimas hidrolíticas são compartilhados por todas as espécies e 27,5% dos genes são únicos para uma única espécie. Os dados sugerem que além de diferenças bioquímicas entre as espécies, diferenças ambientais são fundamentais na produção de enzimas secretadas por cada fungo, devendo ser levado em consideração como estratégia para a obtenção de sobrenadantes capazes de aumentar a eficiência dos coquetéis enzimáticos.

No presente estudo o aumento da conversão de açúcares obtidos quando o coquetel enzimático de *T. reesei* foi suplementado com o sobrenadante bruto de *Pestalotiopsis* sp. pode ser explicado pela presença de oxidorredutases, especialmente a grande quantidade de lacase produzidas por *Pestalotiopsis* sp., sendo enzimas ausentes em *T. reesei*. Além disso, embora o fungo *Pestalotiopsis* sp. tenha apresentado menor atividade de exoglucanase e endoglucanase, um estudo realizado com a cepa *Pestalotiopsis* sp. NCi6 isolada em ambiente salobro (PATEL et al., 2006) relata a produção de polissaracídeo monoxigenases (LPMOs), sendo uma enzima altamente reativa contra celulose e permitindo a celulases hidrolisarem áreas cristalinas altamente resistentes da celulose (EIBINGER et al., 2014) e podendo estar presentes no coquetel enzimático, embora não tenham sido quantificadas por não serem alvo do presente estudo. Isso pode indicar que os dois fungos estudados possuem diferentes características para degradar a biomassa vegetal, uma vez que a produção de polissacarídeo monoxigenases e enzimas lignolíticas são ausentes em *T. reesei* (BERRIN et al., 2014).

A ação simultânea e complementar entre diferentes enzimas também já foi demonstrada em outros estudos. Woolrige (2013) constatou a ação sinérgica entre xilanase e lacase, onde xilanase aumentou a exposição da lignina e facilitando a sua degradação por lacase e outras enzimas lignolíticas.

O presente trabalho demonstrou que enzimas provenientes de diferentes microrganismos podem ser combinadas na preparação de coquetéis enzimáticos, onde a utilização de enzimas oxidativas lignolíticas produzidas por *Pestalotiopsis* sp. em complemento as enzimas celulolíticas produzidas por *Trichoderma reesei* QM9414 foram capazes aumentar a eficiência na produção de açúcares redutores durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Apesar dos promissores resultados, mais estudos são necessários acerca do papel de cada enzima durante o processo e a identificação de novas enzimas e novos microrganismos, possibilitando a formação de complexos mais eficientes. Além de coquetéis enzimáticos formados a partir de diversas enzimas provenientes de diferentes microrganismos, um campo de pesquisa em andamento é a construção de celulossomas a partir de bactérias (MORAIS et al., 2012), que visa a construção de sistemas artificiais onde enzimas celulolíticas livres são convertidas em complexos enzimáticos extracelulares altamente eficientes, onde o conjunto possui vários tipos de enzimas organizadas em torno de uma proteína de atividade não-catalítica, que permite a aderência do complexo à celulose, já tendo sido demonstrado que a incorporação de enzimas oxidativas no complexo (DAVIDI et al., 2016) pode aumentar a conversão de biomassa em açúcares, mostrando a importância na identificação de enzimas lignolíticas mais eficientes e o desenvolvimento de novos campos de pesquisa no ramo do bioetanol.

V Conclusões

No presente projeto foi identificado o fungo filamentoso *Pestalotiopsis* sp., um bom produtor de enzimas oxidorredutases, as quais em complemento as enzimas celulases de *T. reesei* QM9414, podem ser utilizadas na preparação de um coquetel enzimático para degradação de substrato de lignocelulose, como bagaço de cana-de-açúcar.

Desse modo, podemos concluir:

- O fungo *Pestalotiopsis* sp. foi identificado como produtor de enzimas oxidorredutases. Embora seja pouco caracterizado quanto a produção de enzimas lignocelulolíticas, trata-se de um fungo com grande potencial em biotecnologia devido a sua capacidade metabólica para produção de metabólitos secundários com propriedades anti-tumorais, anti-bacterianas e anti-fúngicas.
- Foram determinadas condições de cultura, purificação e análise da atividade enzimática, das enzimas oxidorredutases produzidas por *Pestalotiopsis* sp.
- Nas condições do estudo, foi determinado que a enzima oxidorredutase mais abundante produzida por *Pestalotiopsis* sp. foi a enzima lacase (7,18 U/mg), mostrando baixa produção das enzimas manganês peroxidase (0,12 U/mg) e lignina peroxidase (0,18 U/mg). Além disso, o fungo apresentou baixa produção de endoglucanase (1,00 U/mg) e exoglucanase (0,42 U/mg), porém, é possível a presença de outras enzimas importantes (desidrogenases, monooxigenases de polissacarídeos, xilanases), que por não serem alvo do estudo não foram quantificadas.
- As proteínas do fungo em estudo foram purificadas por cromatografia de troca iônica, porém concluímos que para a diminuição dos custos na produção do coquetel enzimático e maior eficiência é preferível a utilização de extratos enzimáticos brutos a enzimas purificadas.
- O coquetel enzimático preparado misturando enzimas de *T. reesei* QM9414 e *Pestalotiopsis* sp., mostrou ser mais eficiente na liberação de açucares redutores (15,52% g/L) a partir da degradação de bagaço de cana de açúcar (1%) in natura, podendo ser devido a degradação da lignina pelas enzimas oxidorredutases, aumentando o acesso das enzimas hidrolíticas a molécula de celulose.

- Nas condições do estudo, a quantidade de açucares redutores liberados pelo coquetel enzimático preparado para degradação de lignocelulose, foi maior ao reportado na literatura.
- Para a produção de coquetéis enzimáticos mais eficientes devem ser utizadas enzimas provenientes de organismos que possuem diferentes estratégias para a degradação da lignocelulose e capacidade de produzir diferentes enzimas.
- O aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar e a utilização de misturas de enzimas lignocelulolíticas na geração de açúcares é um processo eficiente e viável a nível industrial, sendo uma importante linha de pesquisa no ramo do bioetanol de segunda geração. Apesar dos promissores resultados, mais estudos são necessários acerca do papel de cada enzima durante o processo e a identificação de novas enzimas e novos microrganismos, possibilitando a formação de complexos mais eficientes.

Finalmente, este trabalho, que atingiu os objetivos propostos, irá contribuir para o estudo de novos fungos, produtores de enzimas com potencial utilização na degradação de biomassa ou em outros processos biotecnológicos.

V PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho foram apresentados na 45ª e 46ª Reunião Anual da SBBq (Oxidorredutase enzymes produced by filamentous fungi) e no VIII congresso brasileiro de micologia (Enzimas oxidorredutases produzidas por *Cochliobolus* sp.) e serão aprimorados para publicação. Além do trabalho desenvolvido tive a oportunidade de colaborar na realização de outros projetos junto a colegas do laboratório, participando como colaborador nos projetos "Estudo e Caracterização de enzimas oxidorredutases produzidas por fungos filamentosos" (BIOEN-FAPESP 2014/24107-1) e "Enzimas oxidorredutases do fungo *Cochliobolus* sp."

Para a continuação desse trabalho, pretende-se melhorar as condições de cultura que permitam obter uma maior produção de enzimas de interesse. Assim, será possível purificar, isolar, identificar e caracterizar as enzimas produzidas por *Pestalotiopsis* sp. O fungo identificado neste projeto também poderá ser motivo de estudo para identificar e caracterizar a produção de metabólitos secundários com potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

ADAV, S. S. et al. Label free quantitative proteomic analysis of secretome by Thermobifida fusca on different lignocellulosic biomass. **Journal of Proteomics**, v. 75, 3694-3706, 2012.

ABRANHÃO-NETO, J; et al. Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in Trichoderma reesei. **Biochemistry**, v. 34, n°33, 10456–10462, 1995.

ARANTES, V; SADLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 23, 3-4, 2010.

ARFI, Y; et al. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. **Nature communications**, v. 4, 2013.

AYOB, F. W; SIMARANI, K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: Identification and its hydrolytic enzymes. **Saudi Pharmacy Journal**, v. 24, 273-278, 2016.

BAJPAI, P. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. Springer, Briefs in Green Chemistry for Sustainability, 2016. DOI 10.1007/978-981-10-0687-6_27

BANSAL, R; MUKHERJEE, P.K. The Terpenoid Biosynthesis Toolkit of Trichoderma. **Natural Products Communications**, v. 11, n°4, 431-434, 2016.

BERLIN, A; BALAKSHIN, M. Industrial lignins: analysis, properties and applications. Bioenergy research: Advances and applications, 2014 http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00018-8.

BARROS, J; et al. The cell biology of lignification in higher plants. **Annals of Botany**, v. 115, 1053–1074, 2015.

BENOIT, I; et al. Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. **Biotechnology for Biofuels**, 8:107, 2015.

BERRIN, J; et al. Exploring the Natural Fungal Biodiversity of Tropical and Temperate Forests toward Improvement of Biomass Conversion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, 6483–6490, 2012.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEZERRA, J. D. P. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n°.1, 2015.

BEZERRA, J. D. P; et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 46, 1, 49-57, 2015.

BISCHOFF, R; et al. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei.* **Microbial Cell Factories**, v. 15, n° 106, 2016.

BONUGLI-SANTOS, R. C; et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**. 2015.

BORIN, G. P; et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarkane biomass. **Plos one**, v. 10, 1-20. 2015

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anals of Biochemistry**, n° 7, 248-254, 1976.

CABANA, H; et al. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. **Chemosphere**, v. 67, n° 4, 770-778, 2007.

CAÑERO, D. C; RONCERO, M. I. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v. 98, n° 5, 509-518, 2008.

CARBONE, I; KOHN, L. M. A method for desining primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n° 3, 553-556, 1999.

CARDONA C. A; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresources Technology**, v. 98, 2415-2457, 2007.

CARLE-URIOSTE, J. C; et al. Cellulase induction in Trichoderma reesei by cellulose requires its own basal expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 11, n° 272, 10169-10174, 1997.

CASON, M; SATISHCHANDRA, R. A Cost and Benefit, Case Study Analysis of Biofuels Systems. **Harvard college review of environment and society**, 2014.

CAPLAN, A; et al. Clinical Chemistry, Interpretation and techniques, Williams & Wilkins, 4th edition, 1995.

CAPOLUPO, L; FARACO, V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefiner development. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, 9451–9467, 2016.

CÁZARES-GARCÍA, S. V; et al. Structural and Phylogenetic Analysis of Laccases from *Trichoderma*: A Bioinformatic Approach. **PloS One**, v. 8, n°1, 2013.

CHAMBERGO, F. S. ***Trichoderma reesei*** **na Era Pós-genoma: Genes para Biotecnologia**. 2016. 95f. Tese (Livre-docência) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

CHEN, C. Y; et al . A 24.7-kDa copper-containing oxidase, secreted by *Thermobifida fusca*, significantly increasing the xylanase/cellulase-catalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 97, 8977-8986, 2013.

CHEN, C. Q; et al. Identification and biological characteristics of round leaf spot on blueberry caused by Pestalotiopsis photiniae. **Journal of Northeast Forestry University**, v. 39, 95–98, 2011.

CHEN, H; et al. Screening and Production of Ligninolytic Enzyme by a Marine-Derived Fungal *Pestalotiopsis* sp. J63. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 165, 1754–1769, 2011.

COLLINS, P. J; et al. Reduction of the 2,2′-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. **Applied and environmental Microbiology**, v. 64, n°6, 2026-2031, 1998.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira, Cana-de-açúcar. V. 4, Safra 2017/2018, n°2 – Segundo levantamento. Agosto 2017.

COUTO, S. R; HERRERA, J. L. T;. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, 500-513, 2006.

COUTO, S. R; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, n°6, 558-569, 2007.

DASHTBAN, M; et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, 36-50, 2010.

DA SILVA, A. J; et al. Blue native-PAGE analysis of Trichoderma harzianum secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. **Proteomics,** v. 12, 2729-2738, 2012.

DAVIDI, L; et al. Toward combined delignification and saccharification of wheat straw by a laccase-containing designer cellulosome. **Proceeding of the national academy of sciences**, v. 113, n°39, 2016.

DEBEIRE, P; et al. Enzymatic cocktails produced by *Fusarium graminearum* under submerged fermentation using different lignocellulosic biomasses. **FEMS microbiology letters**, v. 355, 116-123, 2014.

DEDEDEYAN, B; et al. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, 925–929, 2000.

DEKKER, R. F. H; et al. A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp.; influence of carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, 1987–1993, 2001.

DE MELLO; et al. Manual de curadores de germoplasma - Micro-Organismos: Fungos filamentosos. **Embrapa recursos genéticos e biotecnologia**, 2011.

DEL RIO, J. C; et al. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. **Journal of Analitical and Applied Pyrolysis**, v. 74, 110–115, 2005.

DELABONA, P. S; et al. Understanding the cellulolytic system of Trichoderma harzianum P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and alpha-L-arabinofuranosidase. **Bioresources Technology**, v. 131, 500-507, 2013.

DE JONG, E; et al. Evidence for a new extracelular peroxidase. Manganese inhibited peroxidase from white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS 55. **FEBS Letters**, v. 24, n° 299, 107-110, 1992.

DE MAAYER, P; et al. Comparative analysis of the Geobacillus hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis. **BMC Genomics**, v.15:836, 2014.

DE SOUZA, A; et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **BioEnergy Research**, n° 6, 564-579, 2013.

DONDELINGER, E; et al. Contrasted enzymatic cocktails reveal the importance of cellulases and hemicellulases activity ratios for the hidrolysis of cellulose in presence of xylans. **AMB express**, v. 6, n° 24, 2016. DOI 10.1186/s13568-016-0196-x.

DONG, S; et al. Graphene Facilitated Removal of Labetalol in Laccase-ABTS System: Reaction Efficiency, Pathways and Mechanism. **Scientific Reports**, 6:21396, 2016. DOI: 10.1038/srep21396

DRUZHININA, I. S; KUBICEK, C. P. Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotroph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 95, 69-147, 2016.

EGBUTA, M. A; et al. A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance. **Advances in Microbiology**, v. 6, 1140-1158, 2016.

EIBINGER, M; et al. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. **Journal of Biological chemistry**, v. 26, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.602227

EL-DORRY, H; et al. Transcriptional control of the cellulase genes in Trichoderma reesei. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 29, n°7, 905-909, 1996.

EL-GOGARY, S; et al. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in Trichoderma reesei. **Biochemistry**, v. 86, 6138-6141, 1989.

ELISASHVILI, V; KACHLISVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidaseproduction by White-rot *basidiomyces*. **Journal of biotechnology,** v.144, 37-42, 2009.

FALADE, A. O; et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **Microbiology Open**. 2017.

FOREMAN, P. K; et al**.** Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus Trichoderma reesei. **Journal of Biological Chemistry**, v. 22, n° 278(34), 31988-31997, 2003.

FRANSEN, M. C; et al. Immobilised enzymes in biorenewables production. **Chemistry Society Review**, v. 7, n°42(15), 6491-533, 2013.

FURTADO, A. T; et al. Bioetanol combustível: Uma oportunidade para o Brasil. Capitulo 1: Introducao: perspectivas do bioetanol no mercado de combustíveis liquidos para veículos leves. NIPE / UNICAMP. 2009.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n° 12, 1987

GLASS, N. L; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n°4, 1323–1330, 1995.

GOMEZ DEL PUGAR, E. M; SAADEDIN, A; 2014. The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. **Critical Review Microbiology**, v. 40, 236-247.

GONZALEZ, J. C; et al. Production of Trametes pubescens Laccase under Submerged and Semi-Solid Culture Conditions on Agro-Industrial Wastes. **PLOS ONE**, v. 8, 2013.

GOVARTHANAN, M; et al. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the fi lamentous fungus *Penicillium* sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity. : **RSC Advances**. v. 7, 207-216 2017.

GRIGORIEV, I.V; . MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. **Nucleic Acid Research**, v. 42, 2014.

GUPTA, P; et al. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolitic potential. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

HATAKKA, A. Biodegradation of lignin: Lignin, Humic Substances and Coal University of Helsinki, Viikki biocenter, Departament of apllied chemistry and microbiology, 2015. DOI: 10.1002/3527600035.bpol1005

HATAKKA, A; HAMMEL, K. E. Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. **Industrial applications**, 319-340, 2010.

HAO, J; et al. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 34, 233-40, 2006.

HENRIQUE-SILVA, F; et al. Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of Trichoderma reesei are adjacent to its TATA box. **Biochem Biophysics Research Community**, v. 12, n° 228(2), 229-37, 1996.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and microbial technology**, v. 30, n° 4, 454-466, 2002.

HOFRICHTER, M; et al. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 8, n°3, 871-897, 2010.

HWANG, S; et al. Product identification of guaiacol oxidation catalyzed by manganese peroxidase. **Journal of industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, n°4, 487-492, 2008.

ISIK, M; et al. Ionic Liquids and Cellulose: Dissolution, Chemical Modification and Preparation of New Cellulosic Materials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, 11922-11940, 2014.

JANUSZ G; et al. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, 1-12, 2013.

JEEWON, R; et al. Phylogenetic evaluation of species nomenclatureof *Pestalotiopsis* in relation to host association. **Fungal Diversity**, v. 17, 39-55, 2006.

JI, L; et al. Synergy of crude enzyme cocktail from cold-adapted *Cladosporium cladosporioides* Ch2-2 with commercial xylanase achieving high sugars yield at low cost. **Biotechnol Biofuels**, v. 7, n°130, 2014.

JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 10, n° 2, 164-174, 2016 DOI: 10.1002/bbb.1634

JØRGENSEN, H. Production and characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Penicillium* strains. Denmark: Technical University of Denmark. Ph.D. Thesis within Center for Process Biotechnology, BioCentrum-DTU, 2003.

JUNGHANS, C; et al. Biochemical and molecular genetic characterisation of a novel laccase produced by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 84, n° 6, 1095-1105, 2009.

JURADO, M; et al. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresources Technology**. v. 100, 6378-6384, 2009.

KAYLEN, M; et al. Economic feasibility of producing ethanol from lignocellulosic feedstocks. **Bioresorces Technology**, v. 72, 19–32, 2000.

KIM, B; et al. Pretreatment of cellulosic waste sawdust into reducing sugars using mercerization and etherification. **BioResources**, v. 7, 5152-5166, 2012.

KUBICEK C. P; et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. **Genome Biology**, v. 12, n°4, 2011.

KURAWARA, M; et al. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium.* **FEBS**, v.169, n°2, 1984.

KWIATOS, N; et al. Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n° 933, 2015.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Journal of Biotechnology, v. 56, 1-24, 1997.

LELE, S. S.; MADHAVI, V. Laccase: Properties and applications. **Bioresources** v. 4, 1694-1717, 2009.

LEVASSEUR, A; et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology of Biofuels**, v. 6, n° 41, 2013.

LI, F; et al. *Pestalotiopsis* and allied genera from *Camellia*, with description of 11 new species from China. **Scientific reports**. v. 7, n° 866, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-00972-5

LI, M; et al. Current undertanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance. **Frontiers in chemistry**, v. 4, n°45, 2016.

LI, Y; et al. On-site cellulase production and efficient saccharification of corn stover employing cbh2 overexpressing *Trichoderma reesei* with novel induction system. **Bioresource Technology**, v. 238, 643-649, 2017.

LIERS, C; et al. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78 91–102, 2011.

LIU, A. R; et al. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in Pestalotiopsis taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, 528–535, 2010.

LIU, A. R.; et al. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in Pestalotiopsis taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.57, p.528-535, 2010.

LIU, L; et al. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. **Bioengineered**, v. 4, n° 212-223, 2013.

LIU, W; et al. Induction and glucose repression of endo-b-xylanase in the ye-ast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process in Biochemistry**, v. 34, 67-72, 1999.

LOPES, M. S. G; Engineering biological systems toward a suitainable economy. **Journal of industrial microbial biotechnolology**, v. 10, n° 42(6), 813-838, 2015. doi: 10.1007/s10295-015-1606-9.

LUNDELL, T; et al. Metabolism of veratryc acid by lignin degrading white-rot fungi. Biotechnology in pulp and paper manufacture. Butee, Chapter 37, p. 387, 1990.

DE MAAYER, P; et al. Comparative analysis of the Geobacillus hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulosis. **BMC Genomics**, v. 15, n° 836, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N; et al. Pestalotiopsis revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, 121–186, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N; et al. Pestalotiopsis-morphology,phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal diversity**, v.50, 167-187, 2011.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N; Guo, L; Chukeatirote, E; Guo, L;Crous, P. W; McKenzie, E. H. C; Hyde, K. D. *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea). **Mycotaxon**, v. 123, n°15, 47-61, 2013.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N; et al. Improving the backbone tree for the genus *Pestalotiopsis*; addition of *P. steyaertii* and *P. magna*sp. nov. **Mycological Progress**, v. 13, n°3, 617-624, 2014.

MANAVALAN, T; et al. Secretome analysis of Ganoderma lucidum cultivated in sugarcane bagasse. **Journal of Proteomics**, v. 77, 298-309, 2012.

MANUBENS, A; et al. Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete Ceriporiopsis subvermispora. **FEMS Microbiology Letters**, v. 275, n°1, 139-145, 2007.

MARTINEZ, A. T; et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology, v. 8, 195-204, 2005.

MARX, I. J; et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum*S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n° 172, 2013.

MAURYA, D. P; et al. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 biotech**, v. 5, n°5, 597-609, 2015.

MAY, S. W; PADGETTE, S. R. Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: Current Status and Future Potential. **Bio/Technology**, N. 1, 677–686, 1983.

MEAYER, V; et al. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. **Fungal Biological Biotechnology**, v. 3, n° 6, 2016.

METZ, A. M; et al. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. **Microbiology**, v. 146, 2079–2089, 2000.

MEYER, A. S; et al. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **Journal of cereal science**, v. 50, 337-344, 2009.

MIKOLASH, A; SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. Applied Microbiology Biotechnology, v. 82, 605-624, 2009.

MILANEZ, A. Y; et al. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a industria da cana-de-açúcar: uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n°41, 237-249, 2015.

MOHR, A; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy Policy**, v. 63, n° 1, 2013.

MONTECOURT, B. S. *Trichoderma reesei* cellulases. **Trends in Biotechnology**, v. 1, 156-161, 1983.

MOON, Y. H; et al. Biochemical Analyses of Multiple Endoxylanases from the Rumen Bacterium *Ruminococcus albus* 8 and Their Synergistic Activities with Accessory Hemicellulose-Degrading Enzymes. **Applied and environmental microbiology**, v.77, n°15, 5157-5169, 2011.

MORAIS, S; et al. Deconstruction of Lignocellulose into Soluble Sugars by Native and Designer Cellulosomes. **mBio**, v. 3:6, 2012.

MÜLLER, H. E. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie and Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious diseases, Virology, Parasitology.** v. 259, n°2, 151-154, 1985.

NETALA, V. R; et al. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. **International Journal of nanomedicine**, v.11, 5683–5696, 2016.

NEVALAINEN, H; et al. On the safety of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**. v. 15, n° 37(3), 193-200, 1994.

NODVIG, C. S; et al. A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. **PloS One**, v. 15, 10-17, 2015.

NOVOZYMES. Novozymes report 2016: Five year summary. file:///C:/Users/User/Downloads/NovozymesReport2016_5-yearsummary%20(1).pdf. Acesso em 18/12/2017.

OBENG, E. M; et al. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. **Bioresources Bioprocess**, 4:16, 2017.

OGOLA, H. J. O; et al. Molecular characterization of a novel peroxidase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, 7509–7518, 2009.

OGOLA, H. J. O; et al. Advances on bioremediation of wastewater and polluted soil. Chapter 6: Explorations and applications of enzyme-linked bioremediation of sinthetic dyes. 2015. http://dx.doi.org/10.5772/60753.

PALIWAL, R; Rawat A. P., Rawat M., & Rai J. P; Bioligninolysis: recent updates for biotechnological solution. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, 1865–1889, 2012.

PATEL, I; et al. Salt‐responsive lytic polysaccharide monooxygenases from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. NCi6. **Biotechnology of Biofuels**, 9:108, 2016.

PATRICK, F; et al. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju.* **African journal of biotechnology**, v. 10, 10166–10177, 2011.

PEREIRA, J. C; et al. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from Myceliophthora thermophila JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, 122-129, 2016.

PISCITELLI, A; et al. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. **Current Genomics**, v. 12, 104-112. 2011.

PLACIDO, J; CAPAREDA, S. Lignolitic enzymes: a biotechnological alternative for ethanol production. **Bioresources and bioprocessing**, 2-23, 2015.

POLLEGIONI, L; et al. Lignin-degrading enzymes. **FEBS Journal**, v. 282, 1190–1213, 2015.

QIN, L; et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. **Biotechnol Biofuels**, v. 22, 9-70, 2016.

QIN, X; et al. Induction, Purification and Characterization of a Novel Manganese Peroxidase from *Irpex lacteus* CD2 and Its Application in the Decolorization of Different Types of Dye. **PLoS One**, v. 9, n°11, 2014.

RAMOS, J.A.T; et al. The Aspergillus niger multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. **Microbial cell factories**, v. 10, n° 78. 2011.

RAVEN, P. H; et al. Biology of plants. W.H. FREEMAN AND CO., New York and Basingstoke, 2005.

RIBEIRO, D. A; et al. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 428, 1-5. 2012.

RIDDEL, R. W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42,265-270, 1950.

RIZK, M; et al. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 428, 1–5, 2012.

SAJEEWA, S; et al. Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal diversity**, v. 50, 167-187, 2011.

SAKURAI, T; KATAOKA, K. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. **The Chemical Record**, v. 4, 220-229, 2007.

SALVACHÚA, D; et al. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, 7500-7506, 2011.

SAMBROOK, J; et al. Molecular cloning: a laboratorymanual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SAMUELS, G. J. Trichoderma: systematics, the sexual state, and ecology**.** **Phytopatology**, v. 96, n°2, 195-206, 2006.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, 185-194, 2009.

SANCHEZ, O; et al. Delignification Process of Agro-Industrial Wastes an Alternative to Obtain Fermentable Carbohydrates for Producing Fuel. **Environmental sciences**, 2011.

SARITHA, M; et al. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. **Indian J Microbiol**, v. 52, 122-130, 2012.

SARTORI, T; et al. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using Trichoderma viride. **BioMed Research International**, 2015. http://dx.doi.org/10.1155/2015/342716

SCHERER, M; et al. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology letters**. v. 30, n°2, 207-213, 2001.

SCHMIDT, O; Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection, and Use, Chapter 3: Physiology Berlin; New York: Springer, 2006.

SHARMA, D; et al. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus Pestalotiopsis neglecta BAB-5510 isolated from leaves of Cupressus torulosa D.Don. **3 Biotech**, 6:210, 2016.

SLOMCZYNSKI, D; et al. Production and Characterization of Laccase from Botrytis cinerea 61-34. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, 907-912. 1995.

SOYGUN, K; et al. Investigation of Mechanical and Structural Properties of Blend Lignin-PMMA. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, 2013.

SQUINA, F. M; et al. The Penicillium echinulatum secretome on sugar cane bagasse. PLoS One, v. 7, 2012. e50571

STROBEL, G; et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, na endophytic fungus of *Taxus wallachiana.* **Microbiology**, v. 142, 435-440, 1996.

SUM, J; et al. Deciphering Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated with Hemicellulose Degradation in *Neurospora crassa.* **Eucaryotic Cell**, 482-493, 2012.

SZCZERBOWSKI, D; et al. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrates Polymers**, v. 114, 95-101, 2014.

TANG, P; et al. Production of Monomeric Aromatic Compounds from Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber Lignin by Chemical and Enzymatic Methods. **BioMed Research International**, v. 15, ID 891539, 2015.

THAKUR, V. K; et al. Review: Raw Natural Fiber–Based Polymer Composites. **International journal of Polymer Analysis and characterization**, v. 19, 2014.

TIEN, M; KIRK, T. K. Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**, v. 12, n° 221, (4611):661-3, 1983.

TIEN, M.; KIRK, T. K; Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In-Methods in Enzymology, Biomass Part B: Lignin, Pectin, and Chitin. eds.Wood, W.A., Kellogg, S.T. USA, **Elsevier**, v. 161, 238-249, 1988.

VARES, T; et al. Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. **Applied and environmental microbiology**, 3515–3520, 1995.

VALENCIA, E.Y; CHAMBERGO, F. S; Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics Biology**, v. 60, 9-18, 2013.

VAN DEN BRINK, J; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, 1477–1492, 2011.

VILGAYS, R; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n° 8, 4238-4246, 1990.

WAN, C; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 30, 1447–1457, 2012.

WANG, F; et al. Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, 572-578, 2013.

WANG, X; et al . Genomic and transcriptomic analysis of the endophytic fungus Pestalotiopsis fici reveals its lifestyle and high potential for synthesis of natural products. **BMC genomics**, 16-28, 2010.

WHITE, T. J; et al, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics, 1990.

Woolridge, E. M. Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass. **Catalysts,** v. 4, 1-35, 2014.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. Trends **Biotechnology**, v. 25, 153-157, 2007.

XU, J; et al. Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. **Fungal Diversity**, v. 66, 37–68, 2014.

YANG, L; et al. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. Natural Product Reports, v. 29, n° 6, 622-641, 2012.

ZVIELY, 2013 - Converting Lignocellulosic Biomass to Low Cost Fermentable Sugars. **Green Energy and Technology**, Ed. Fang, Zhen, Springer, 2013

ZHANG, Y. H; HONG, J. Y. X. **Cellulase assays**. Methods in Molecular Biology. v. 581, 213-231, 2009.

ZHANG, Y. J; et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n°1, 114-118, 2010.

ANEXOS

Trabalhos apresentados em congressos e reuniões científicas:

Garcia, F. S; Mergel, C. M; Chambergo, F. S. Oxidorreductase enzymes produced by filementous fungi. XLV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, 21/06/2017.

Garcia, F. S; Mergel, C. M; Chambergo, F. S. Enzimas oxidorredutases produzidas por *Cochliobolus* SP. VIII congresso brasileiro de micologia, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 05/10/2016.

Garcia, F. S; Iogi, A. A; Chambergo, F. S. Oxidorreductase enzymes produced by filementous fungi. XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 29/06/2017.

APÊNDICE I - Preparo dos reagentes utilizados no estudo

ABTS: Foi preparada uma solução estoque de ABTS 50 mM em água e estocada a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Para a realização do ensaio enzimático de lacase 500 µL de ABTS 5 mM são preparados na hora. Para a realização do zimograma 100 mL de ABTS 2 mM foram preparados na hora.

Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1): Em 150 mL de água foram adicionados 58g de acrilamida e 2 g de bis-acrilamida e diluídos em um agitador magnético. Após diluir o volume foi completado com H_2O até 200 mL e filtrado em papel de filtro.

APS 20%: 2 g de persulfato de amônia (APS) foi diluído em 10 mL de H_2O.

Avicel 1%: Para a preparação do Avicel para indução das culturas e realização de ensaios enzimáticos o reagente foi colocado em tubo falcon de 50 mL e lavado com H_20 2x, HCl 1mM 1x, H_2O 2x e tampão fosfato 0,1M (pH6.0) 2x. Em seguida a solução foi autoclavada em tampão fosfato e lavada 1x com tampão fosfato estéril. Para cada lavagem a solução foi centrifugada a 4000 rpm. A solução foi estocada a 4°C.

$CaCl_2$ 1M: Para cada 50 mL foram adicionados 7,35 g de $CaCl_2$.

CMC 1%: Em tubo falcon de 50 mL foi diluído 1% de carboximetilcelulose em 25 mL de água. Para diluir o CMC a solução foi incubada a 55°C e em seguida o volume de H_2O completado para 30 mL.

Corante Coomassie-blue: 0,2 g de coomassie-blue foi dissolvido em 50 mL de etanol, 10 mL de ácido acético e 40 mL de H2O.

$CuSO_4$: Em 10 mL de H2O foi preparada uma solução estoque de 100mM de CuSO4 e estocada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

DMP: Foram preparados 40 mL de solução. Para o preparo da solução de trabalho 20 mM o reagente foi diluído em 30 mL H_2O utilizando um agitador magnético. Devido a baixa solubilidade diluir a solução gradualmente. Após diluir completar para um volume final de 40 mL.

DMPPDA: Foram preparados 40 mL de solução. Para o preparo da solução de trabalho 20 mM o reagente foi diluído em 30 mL H_2O utilizando um agitador magnético. Devido

a baixa solubilidade diluir a solução gradualmente. Após diluir completar para um volume final de 40 mL.

DNS: 1g de ácido 3,5 dinitrossalicílico foi diluído em 20 mL de NaOH 2M e 50 mL de H_2O destilado. A solução foi levada ao agitador magnético até dissolver completamente. Em seguida foram adicionados 30 g de tartarato Na+/K+. Após dissolver completamente o volume foi completado para 100 mL com H_2O e filtrada em papel de filtro. A solução foi estocada em um frasco âmbar e ao abrigo da luz.

Gel de acomodação não desnaturante: Foram adicionados 0,8 mL de tampão staking, 0,75 mL de glicerol 87% e 5 mL de H_2O. Em seguida foram adicionados 40 µL de APS e 20 µL de TEMED.

Gel de acomodação SDS-Page: Foram adicionados 800 µL de acrilamida, 1 mL de tampão stacking e completado até 4 mL com H_2O. Em seguida foi adicionado 45 µL de APS e 25 µL de TEMED.

Gel de agarose 1%: Para cada 30 mL de gel foram utilizados 30 mL de TAE 1X e 0.3 g de agarose. A solução foi aquecida em forno micro-ondas até diluir a agarose e antes de polimerizar adicionado o corante Cyber-Safe (Invitrogen). Em seguida a solução foi despejada no suporte do gel e colocado o pente de espessura desejada. Após solidificar foi adicionado tampão TAE 1X até cobrir toda a superfície do gel.

Gel de separação não desnaturante: Foram adicionados 5 mL de tampão resolving buffer, 1,5 mL de glicerol 87%, 8,5 mL de acrilamida/Bis-acrilamida e 5 mL de H_2O. Em seguida foram adicionados 75µL de APS, 40 µL de TEMED e aplicados sob a cuba de eletroforese antes de polimerizar.

Gel de separação SDS-Page: Foram adicionados 5 mL de acrilamida, 3 mL de tampão resolving e 5 ml de H_2O. Em seguida foi adicionado 75 µL de APS e 45 µL de TEMED e aplicados sob a cuba de eletroforese antes de polimerizar.

Glicerol 30%: Foram diluídos 68 mL de Glicerol 87% até 200 mL utilizando H_2O destilada.

Glicose: A solução padrão de glicose foi preparada diluindo 0,1 g de glicose em 50 mL de H_2O destilada.

Guaiacol: Para o preparo da solução de trabalho foram diluídos 5% da solução estoque de guaiacol junto com 50% de etanol para um volume final de 20 mL. Concentração final: 200 mM. A solução foi estocada a 5°

HCl 1mM: 60 µL de HCl 8M foram diluídos em 500 mL de H_2O destilada.

HCl 50%: Para cada 100 mL de solução foram utilizados 50 mL de solução stock HCl 8M e completados com 50mL de H_2O.

$MnSO_4$: Em 40 mL de H_2O foi preparada uma solução estoque de 100 mM de $MnSO_4$ e estocada a 5°. Para o preparo da solução de trabalho de 10mM 1mL foi adicionado em 9 mL de H_2O e estocada a 5°.

NaCl: Foi preparada 500 mL de uma solução estoque a 4M e quando necessário utilizada no preparo de NaCl 1M e outros reagentes.

NaOH: Foi preparado uma solução estoque 200 mL de NaOH 2M e utilizado quando necessário.

Solução de metais (1000x): Para cada 50 mL foram adicionados 0,25 g de $FeSO_4$, 0,08 g de $MnSO_4$, 0,08 g de $ZnSO_4$ e 0,10 g de $CaCl_2$.

TAE 1X: 0.04M de Tris-acetato e 0.001M de EDTA.

TAE 50X: Para cada litro foram utilizados 242 g de Tris base, 51,7 mL de ácido acético glacial e 100mL de EDTA 0.5M (pH8.0)

Tampão citrato: Foram dissolvidos 210 g de ácido cítrico e 60 g de NaOH em 750 mL de H_2O destilada. Após diluir o volume foi completado para 1000 mL e o pH ajustado para 4.5 utilizando NaOH 5M.

Tampão de corrida para gel não desnaturante: Em 1 L de H2O foram diluídos 3,02 g de tris-base e 14,4 g de glicina.

Tampão de corrida para gel SDS-Page: Em 1 L de H2O foram diluídos 1 g de SDS, 3 g de tris-base e 18,8 g de glicina.

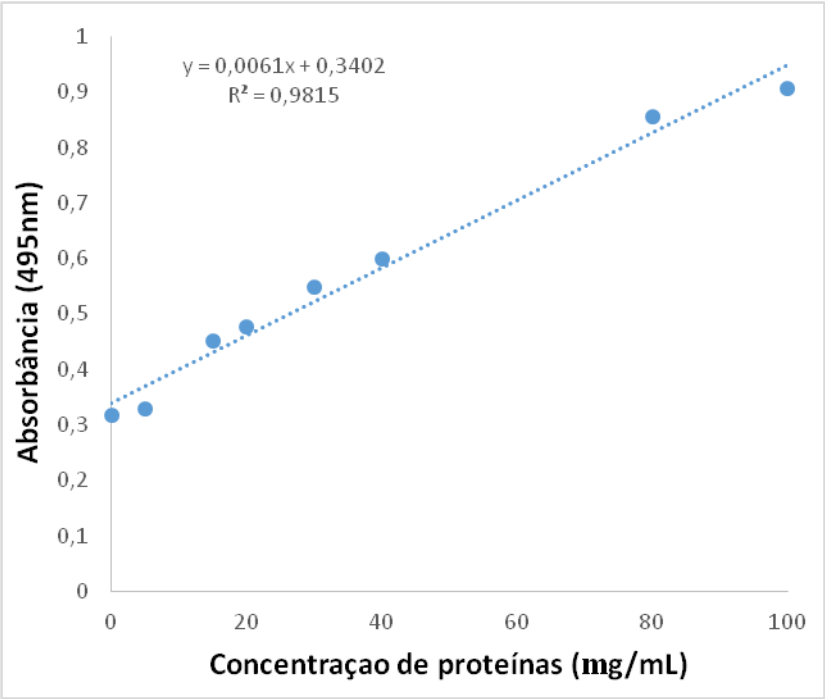
Tampão CTAB: Para cada 10 mL de tampão foram utilizados 3 mL de CTAB (10%), 2,8 mL de NaCl 5M, o,4 mL de EDTA 0.5M (pH8.0), 1 mL de Tris-Cl 1M (pH8.0), 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVP), 20 μL de β-mercaptoetanol e 2,48 mL de H_2O.

Tampão fosfato 0,1M: Em 500 mL de H_2O foram diluídos 1,5 g de K_2HPO_4 e 5,9g de KH_2PO_4. Em seguida a solução foi autoclavada e estocada a temperatura ambiente. pH: 6.0.

APÊNDICE II - Curva padrão de proteínas e proteínas totais dos fungos *Pestalotiopsis* sp. e *Trichoderma reesei*

Curva padrão de proteínas:

mg/mL	0	5	15	20	30	40	80	100
	0,3163	0,3305	0,4555	0,4746	0,5546	0,5967	0,8669	0,9095
	0,3185	0,328	0,4481	0,4778	0,5428	0,6027	0,8464	0,9065
Média:	0,3174	0,32925	0,4518	0,4762	0,5487	0,5997	0,85665	0,908



Proteínas totais presente no sobrenadante do fungo *Pestalotiopsis* sp. durante o cultivo em meio kirk contendo bagaço de cana-de-açúcar.

Dias	2	4	6	8	10	12
Abs: 495nm	0,4637	0,5138	0,5331	0,5432	0,5542	0,5394
Abs: 495nm	0,4592	0,5073	0,495	0,5607	0,5088	0,5462
Média:	0,46145	0,51055	0,51405	0,55195	0,5315	0,5428
Proteína total:	18,47727	25,91667	26,44697	32,1894	28,98485	30,80303

Proteínas totais presentes no sobrenadante do fungo *Trichoderma reesei* durante o cultivo em meio mínimo contendo avicel 1%.

Dias	2	3	4	6	8	10
Abs: 495nm	0,46875	0,4826	0,5234	0,5737	0,6207	0,6561
Abs: 495nm	0,464324	0,4728	0,5252	0,5792	0,6153	0,6515
Média:	0,4656	0,4766	0,5248	0,5714	0,618	0,6528
Proteína total:	19,11	20,77	28,07	35,14	42,19	47,46

Proteínas totais presente nas frações do fungo *Pestalotiopsis* sp. após purificação por cromatografia por troca iônica.

Fração	20	21/22	23
Abs: 495nm	1,1003	0,4318	0,3491
Abs: 495nm	1,0029	0,4225	0,3446
Média:	1,0065	0,4275	0,3475
Proteína total:	101,06	13,33	1,21

Proteínas totais presente no sobrenadante do fungo *Pestalotiopsis* sp. a ser utilizado na montagem do coquetel enzimático:

Dias	2	8	Concentrado
Abs: 495nm	0,4791	0,6810	0,7853
Abs: 495nm	0,4738	0,6714	0,7811
Média:	0,4762	0,6751	0,7838
Proteína total:	20,764	50,875	67,376

Proteínas totais presente no sobrenadante do fungo *Trichoderma reesei* a ser utilizado na montagem do coquetel enzimático:

Dias	2	3	Concentrado
Abs: 495nm	0,4812	0,5137	0,5534
Abs: 495nm	0,4755	0,5083	0,5652
Média:	0,4783	0,5104	0,5499
Proteína total:	21,015	25,90	31,987

APÊNDICE III - Atividade enzimática de enzimas oxidorredutases do fungo *Pestalotiopsis* sp. durante cultivo em bagaço de cana-de-açúcar

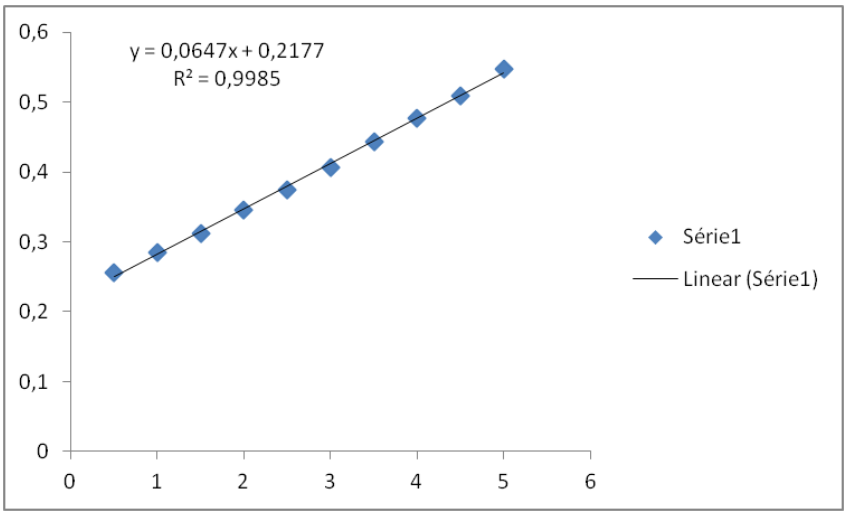
Dados utilizados na preparação da figura 10 A:

Atividade lacase:

2° dia:

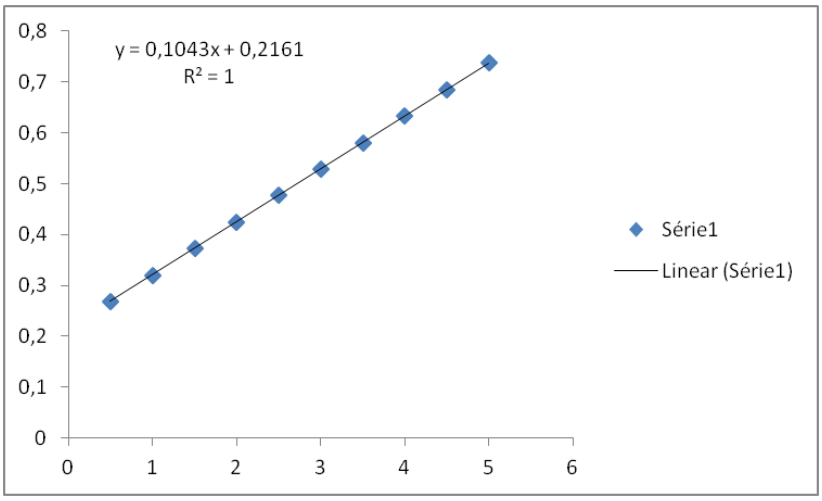
N°1	0,2536	0,277	0,3025	0,3366	0,3676	0,3994	0,4383	0,4745	0,5111	0,5513
N°2	0,2532	0,2811	0,3121	0,338	0,3685	0,3978	0,4321	0,4614	0,4891	0,5259
N°3	0,2617	0,2956	0,3235	0,3606	0,3887	0,422	0,4588	0,4954	0,5286	0,5629
Tempo*:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,256167	0,284567	0,3127	0,345067	0,374933	0,4064	0,443067	0,4771	0,5096	0,5467

- Tempo: em minutos



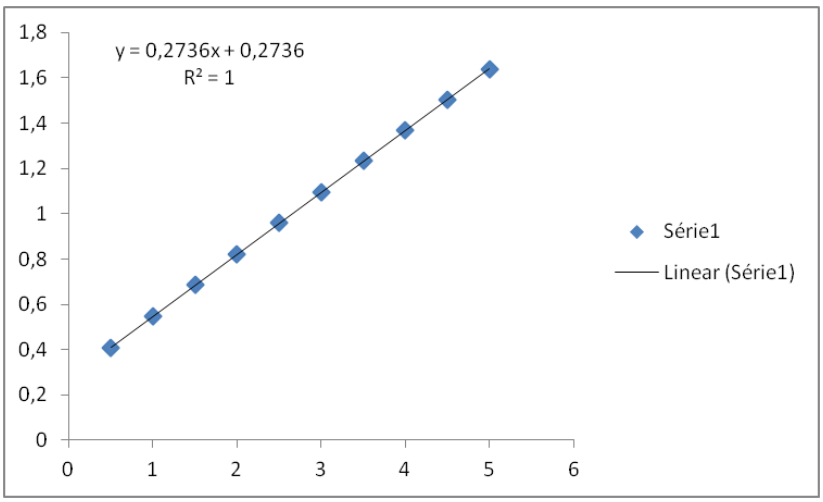
4° dia

N°1	0,2655	0,316	0,3657	0,4167	0,4675	0,5172	0,5687	0,6194	0,6706	0,7217
N°2	0,2719	0,3256	0,3794	0,4343	0,4885	0,5411	0,5944	0,6478	0,7006	0,7532
N°3	0,269	0,3201	0,3719	0,4229	0,4747	0,5275	0,5806	0,6327	0,6858	0,7401
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média	0,2688	0,320567	0,372333	0,424633	0,4769	0,5286	0,581233	0,6333	0,685667	0,738333



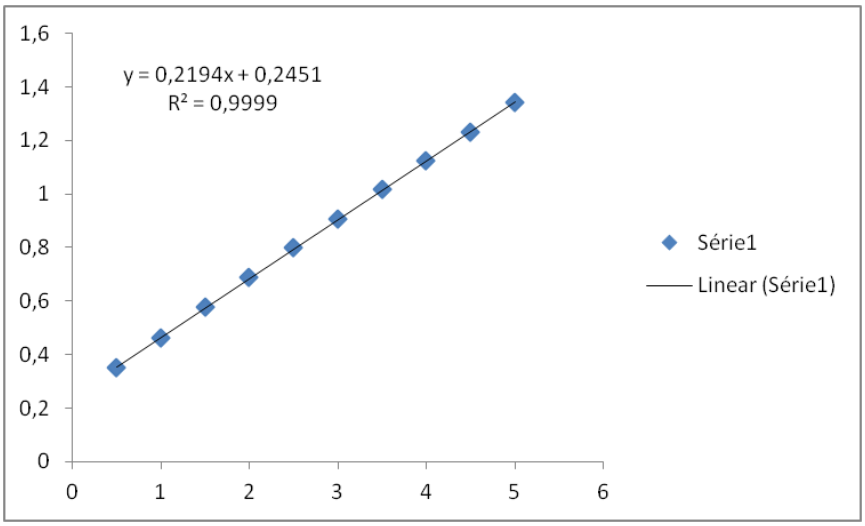
6° dia

N°1	0,4106	0,5503	0,689	0,8241	0,9604	1,0977	1,2328	1,3694	1,5038	1,6391
N°2	0,4137	0,5556	0,6953	0,834	0,9737	1,1131	1,251	1,3889	1,5265	1,6609
N°3	0,3951	0,5345	0,673	0,808	0,9435	1,0792	1,2132	1,3484	1,4824	1,6158
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,406467	0,5468	0,685767	0,822033	0,9592	1,096667	1,232333	1,3689	1,504233	1,6386



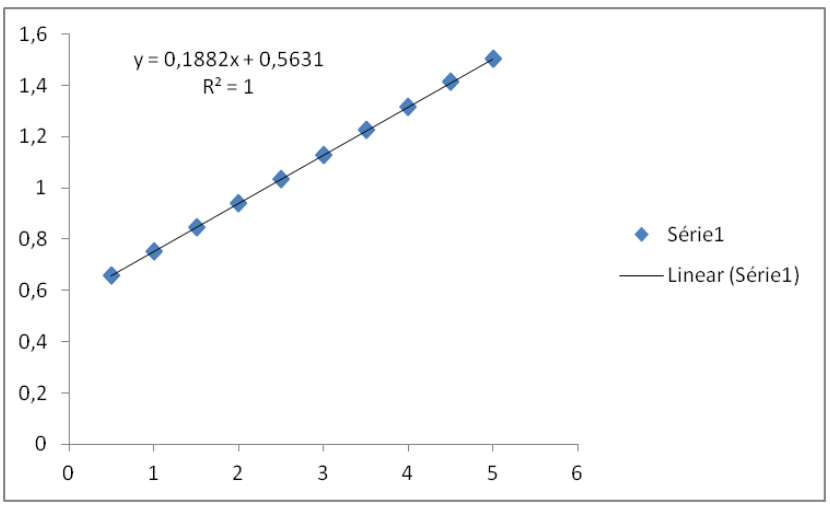
8° dia

N°1	0,347	0,4543	0,5638	0,6709	0,7779	0,8838	0,9902	1,0959	1,2002	1,3047
N°2	0,3559	0,4707	0,5898	0,6965	0,8156	0,9176	1,0262	1,1338	1,2432	1,3509
N°3	0,3489	0,4614	0,5751	0,6886	0,802	0,9143	1,0264	1,138	1,249	1,3605
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,3506	0,462133	0,576233	0,685333	0,7985	0,905233	1,014267	1,122567	1,2308	1,3387



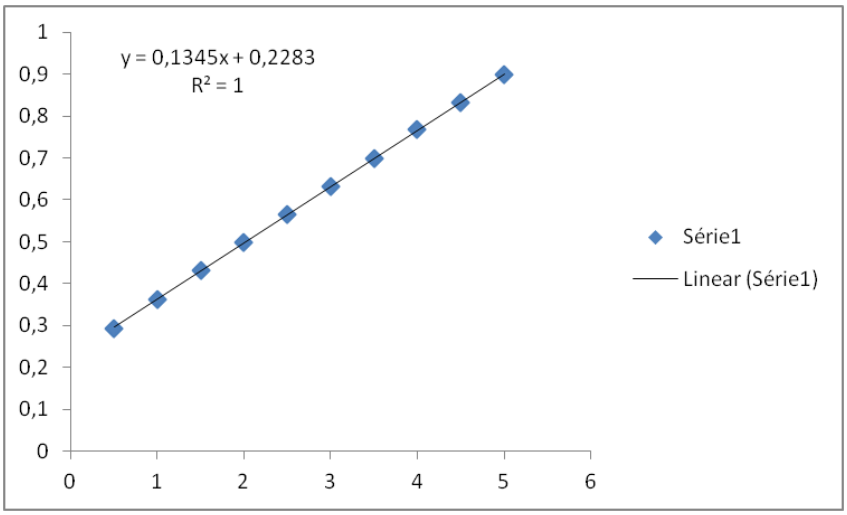
10° dia:

N°1	0,6471	0,7416	0,8325	0,9251	1,0174	1,1097	1,2045	1,2968	1,3886	1,4813
N°2	0,689	0,7892	0,8876	0,9878	1,0874	1,1882	1,2892	1,3806	1,4871	1,5813
N°3	0,6353	0,7264	0,8152	0,9036	0,994	1,0842	1,1758	1,2672	1,3576	1,4491
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,657133	0,7524	0,8451	0,938833	1,032933	1,127367	1,223167	1,314867	1,4111	1,5039



12° dia:

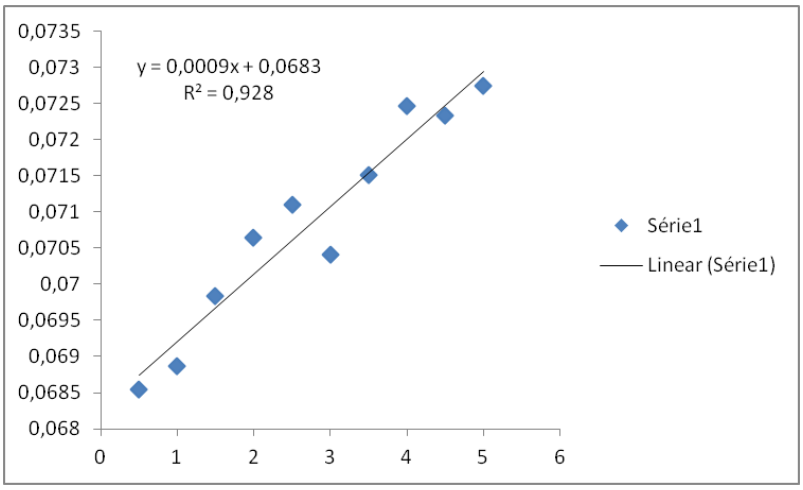
N°1	0,2934	0,3618	0,4269	0,4933	0,5586	0,624	0,6888	0,7548	0,8193	0,8832
N°2	0,2964	0,3674	0,4348	0,5024	0,5695	0,6383	0,7057	0,7749	0,8409	0,9071
N°3	0,2901	0,3611	0,4301	0,4983	0,5665	0,6361	0,7044	0,7734	0,8393	0,9065
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,2933	0,363433	0,4306	0,498	0,564867	0,6328	0,699633	0,7677	0,833167	0,898933



Atividade manganês peroxidase:

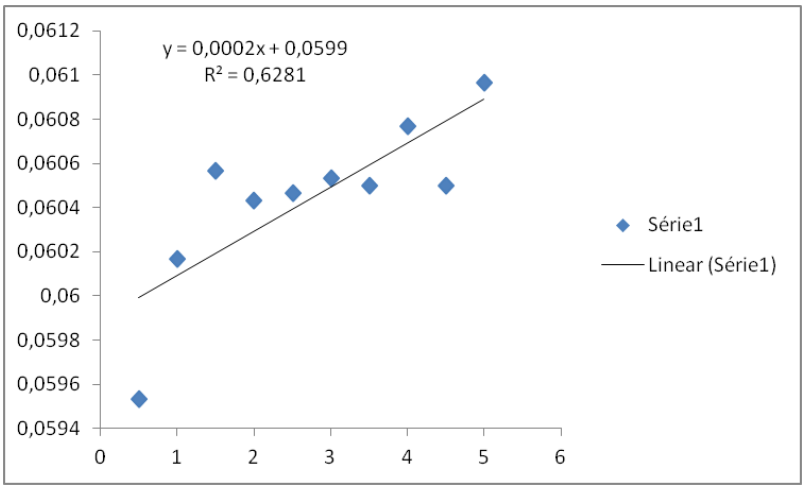
2° dia:

N°1	0,0697	0,0703	0,0704	0,0714	0,0715	0,072	0,0729	0,0736	0,074	0,0745
N°2	0,0671	0,067	0,0676	0,0681	0,0684	0,0683	0,0693	0,0699	0,07	0,0701
N°3	0,0688	0,0693	0,0715	0,0724	0,0734	0,0709	0,0723	0,0739	0,073	0,0736
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,068533	0,068867	0,069833	0,070633	0,0711	0,0704	0,0715	0,072467	0,072333	0,072733



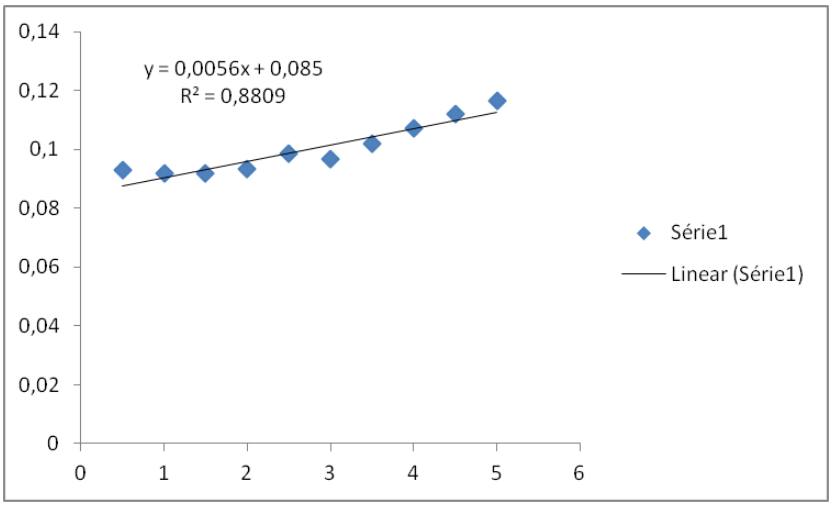
4° dia:

N°1	0,058	0,0583	0,0592	0,0596	0,059	0,0588	0,0591	0,0592	0,0586	0,0593
N°2	0,0581	0,0588	0,059	0,0583	0,0589	0,0589	0,0584	0,0591	0,0587	0,0592
N°3	0,0625	0,0634	0,0635	0,0634	0,0635	0,0639	0,064	0,064	0,0642	0,0644
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,059533	0,060167	0,060567	0,060433	0,060467	0,060533	0,0605	0,060767	0,0605	0,060967



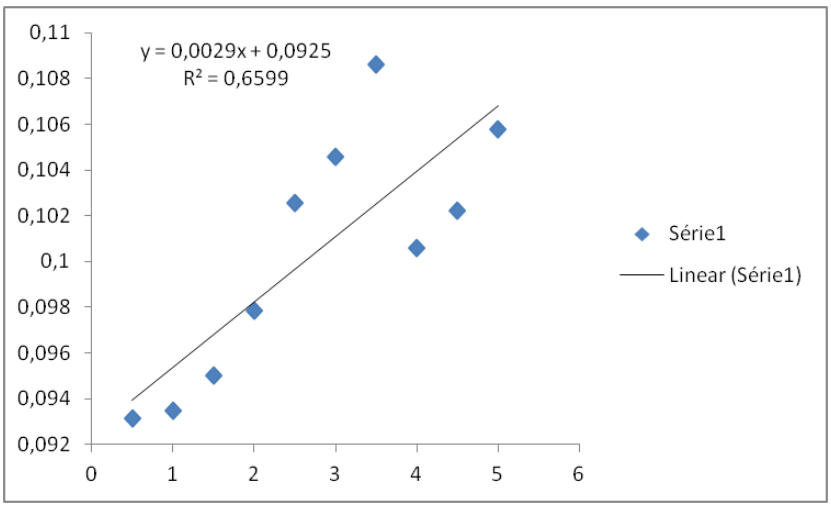
6° dia:

N°1	0,0953	0,0938	0,0939	0,0955	0,1081	0,0985	0,1096	0,1191	0,1246	0,1348
N°2	0,088	0,0888	0,088	0,09	0,0921	0,0943	0,0967	0,0977	0,1002	0,1114
N°3	0,0951	0,0924	0,0932	0,0947	0,095	0,0973	0,0998	0,1048	0,1117	0,1036
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,0928	0,091667	0,0917	0,0934	0,0984	0,0967	0,102033	0,1072	0,112167	0,1166



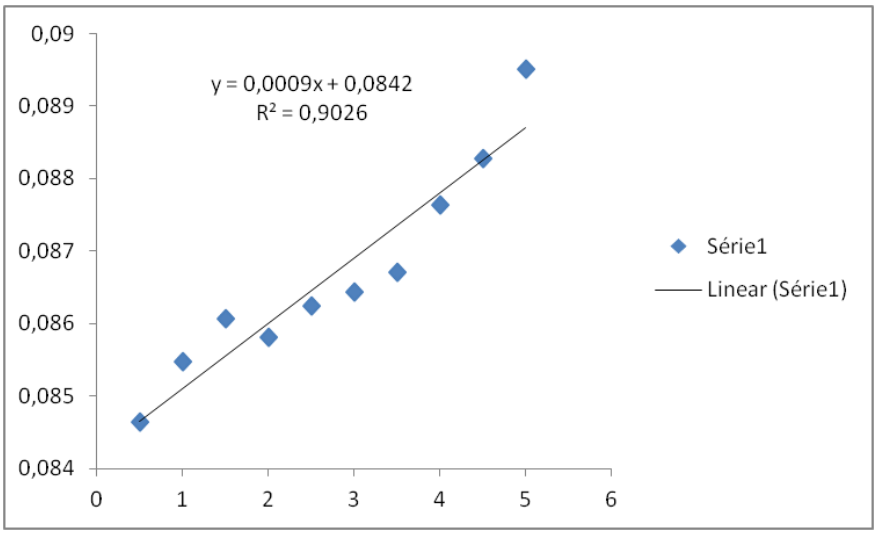
8° dia:

N°1	0,097	0,1005	0,1024	0,1112	0,1218	0,13	0,14	0,1148	0,1183	0,1238
N°2	0,0909	0,0888	0,0888	0,0899	0,0931	0,0901	0,0916	0,0921	0,0927	0,0949
N°3	0,0916	0,0912	0,0939	0,0924	0,0928	0,0936	0,0942	0,0949	0,0956	0,0986
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,093167	0,0935	0,095033	0,097833	0,102567	0,104567	0,1086	0,1006	0,1022	0,105767



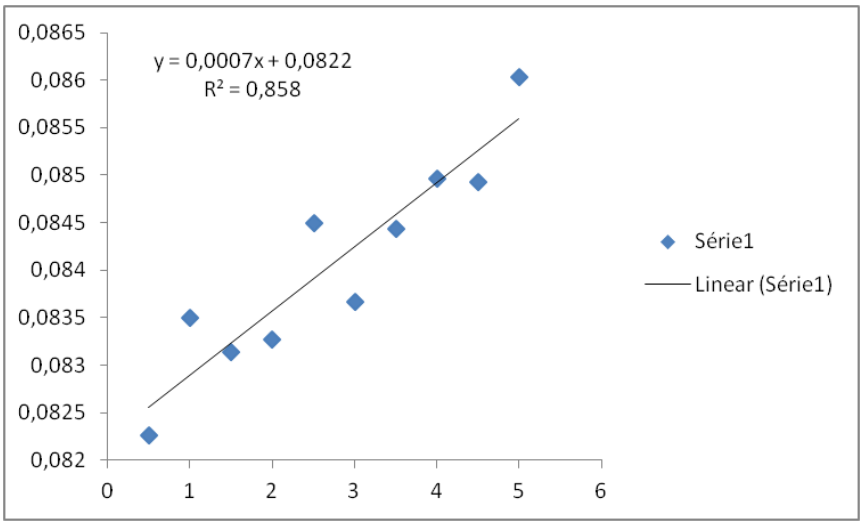
10° dia:

N°1	0,0824	0,0821	0,0828	0,0833	0,0842	0,0835	0,0838	0,0839	0,0846	0,0851
N°2	0,0878	0,0908	0,0918	0,09	0,0903	0,0919	0,0912	0,0933	0,0946	0,0967
N°3	0,0837	0,0835	0,0836	0,0841	0,0842	0,0839	0,0851	0,0857	0,0856	0,0867
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,084633	0,085467	0,086067	0,0858	0,086233	0,086433	0,0867	0,087633	0,088267	0,0895



12° Dia:

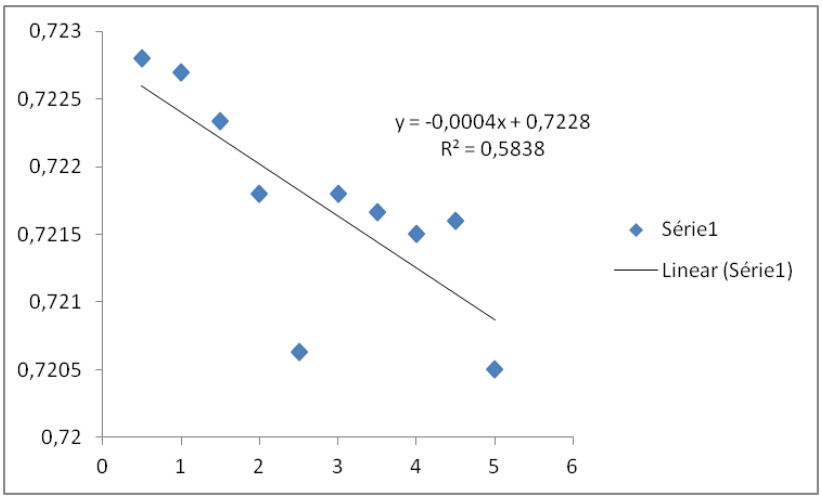
N°1	0,0832	0,0855	0,0839	0,0851	0,0844	0,0843	0,0852	0,0853	0,0857	0,0859
N°2	0,0823	0,0828	0,0831	0,0822	0,0858	0,0835	0,0847	0,0857	0,0848	0,0871
N°3	0,0813	0,0822	0,0824	0,0825	0,0833	0,0832	0,0834	0,0839	0,0843	0,0851
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,082267	0,0835	0,083133	0,083267	0,0845	0,083667	0,084433	0,084967	0,084933	0,086033



Atividade lignina peroxidase:

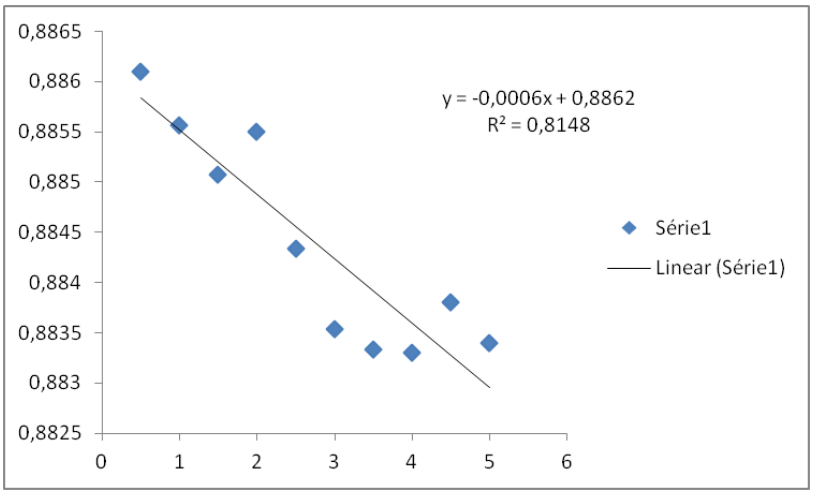
2° dia:

N°1	0,7122	0,7101	0,7111	0,7105	0,7103	0,7119	0,7121	0,7117	0,7119	0,7114
N°2	0,7301	0,734	0,7313	0,7306	0,7291	0,7292	0,7296	0,7295	0,7289	0,7284
N°3	0,7261	0,724	0,7246	0,7243	0,7225	0,7243	0,7233	0,7233	0,724	0,7217
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,7228	0,7227	0,722333	0,7218	0,720633	0,7218	0,721667	0,7215	0,7216	0,7205



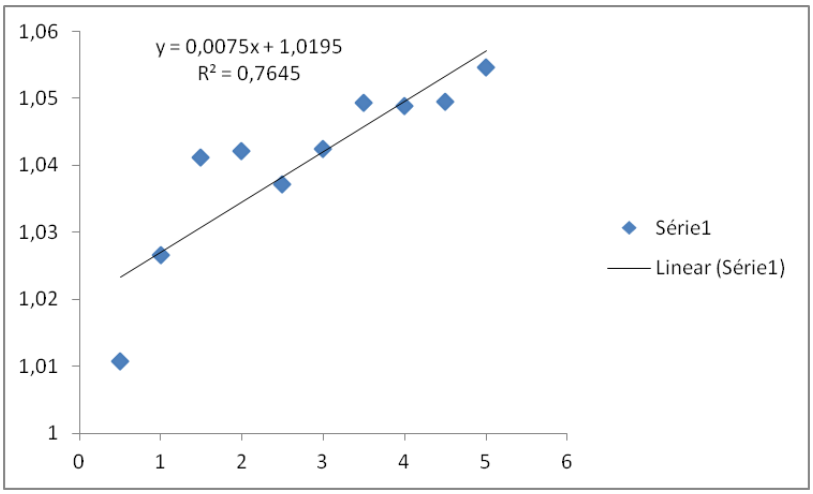
4° dia:

N°1	0,8817	0,88	0,88	0,8802	0,8791	0,8781	0,8783	0,8776	0,8786	0,8782
N°2	0,8924	0,8922	0,8908	0,8912	0,8907	0,8898	0,8894	0,8902	0,8901	0,8891
N°3	0,8842	0,8845	0,8844	0,8851	0,8832	0,8827	0,8823	0,8821	0,8827	0,8829
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,8861	0,885567	0,885067	0,8855	0,884333	0,883533	0,883333	0,8833	0,8838	0,8834



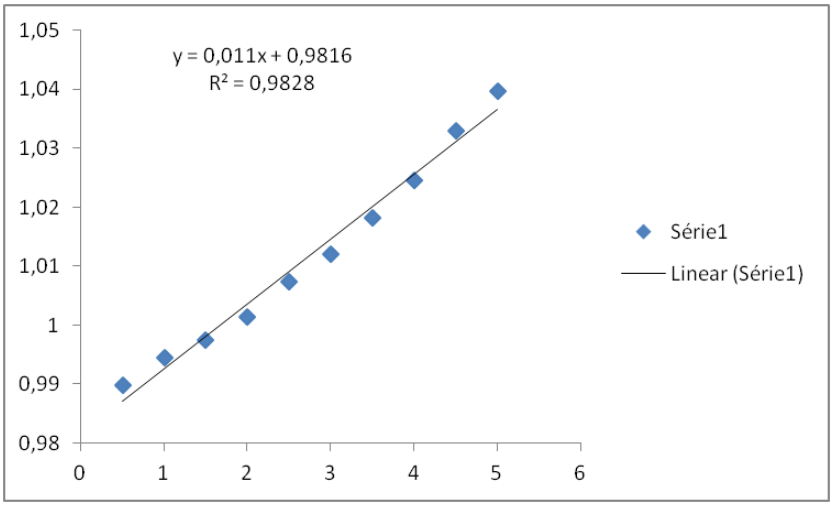
6° dia:

N°1	1,0084	1,0091	1,0212	1,0288	1,0259	1,0271	1,0425	1,0447	1,0519	1,055
N°2	1,0199	1,0437	1,0464	1,0625	1,0534	1,0573	1,0707	1,065	1,0645	1,0689
N°3	1,0037	1,0268	1,0559	1,0349	1,0322	1,0426	1,0345	1,0367	1,032	1,0396
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	1,010667	1,026533	1,041167	1,042067	1,037167	1,042333	1,049233	1,0488	1,049467	1,0545



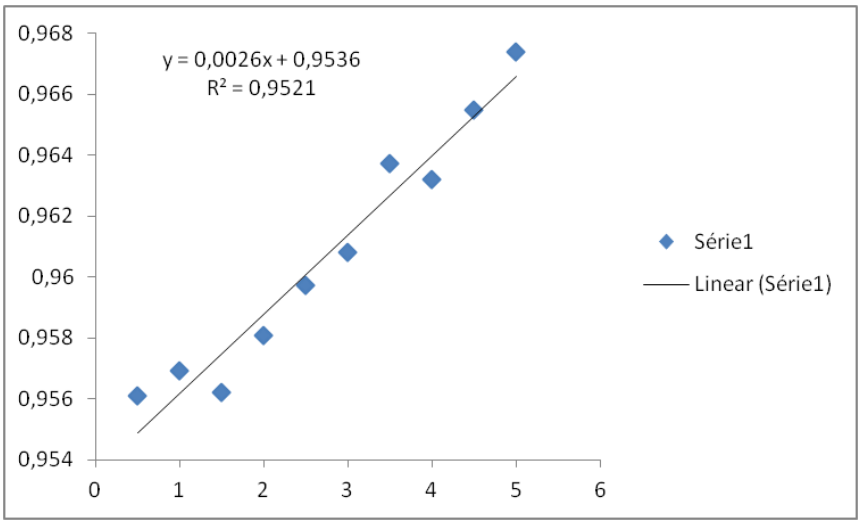
8° dia:

N°1	0,9825	0,9892	0,9928	0,997	1,0019	1,0064	1,0114	1,0175	1,0227	1,0273
N°2	1,0023	1,0023	1,0025	1,0047	1,0096	1,0112	1,0149	1,0193	1,0278	1,0316
N°3	0,9848	0,9921	0,9974	1,0028	1,0106	1,0185	1,0285	1,037	1,0484	1,0605
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,989867	0,994533	0,997567	1,0015	1,007367	1,012033	1,018267	1,0246	1,032967	1,0398



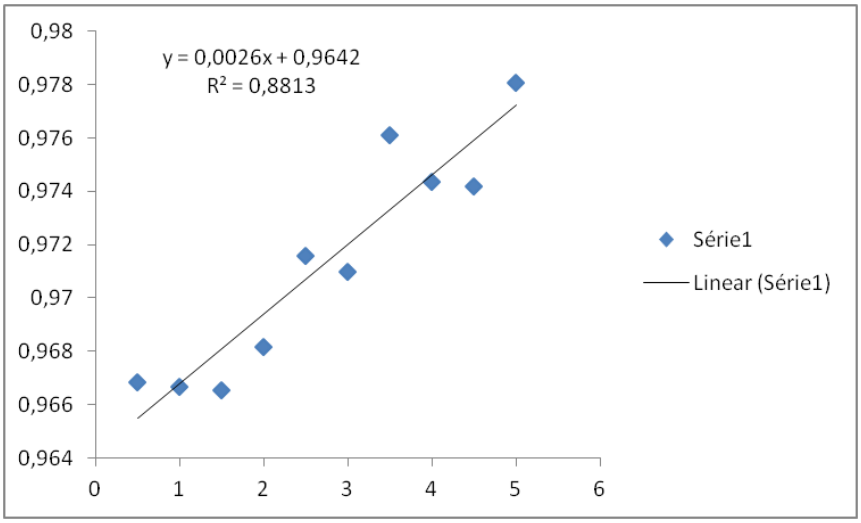
10° dia:

N°1	0,9375	0,9388	0,9384	0,9405	0,9414	0,9414	0,9434	0,9447	0,9473	0,949
N°2	0,9781	0,9769	0,9751	0,9776	0,9797	0,9807	0,9831	0,9828	0,9859	0,9872
N°3	0,9527	0,955	0,9551	0,9561	0,958	0,9603	0,9646	0,962	0,9632	0,9659
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,9561	0,9569	0,9562	0,958067	0,9597	0,9608	0,9637	0,963167	0,965467	0,967367



12° dia:

N°1	0,9625	0,9633	0,9639	0,9668	0,9686	0,9711	0,979	0,9784	0,9729	0,9866
N°2	0,9637	0,9624	0,9638	0,9645	0,9739	0,9687	0,9756	0,9703	0,976	0,9726
N°3	0,9743	0,9744	0,972	0,9732	0,9723	0,9732	0,9737	0,9744	0,9737	0,975
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,966833	0,9667	0,966567	0,968167	0,9716	0,971	0,9761	0,974367	0,9742	0,978067



Cálculo atividade de lacase:

Triplicata I:

Dia	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	36000	0,0668	0,04	1,855556	46,38889	10,87	4,282051
4	36000	0,1014	0,04	2,816667	70,41667	16,78	4,091109
6	36000	0,2727	0,04	7,575	189,375	26,44	7,160556
8	36000	0,2129	0,04	5,913889	147,8472	32,18	4,594123
10	36000	0,1853	0,04	5,147222	128,6806	28,98	4,423394
12	36000	0,1309	0,04	3,636111	90,90278	30,8	2,951099

Triplicata II:

Dia	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	36000	0,067	0,04	1,861111	46,52778	10,87	4,294872
4	36000	0,1046	0,04	2,905556	72,63889	16,78	4,220217
6	36000	0,2709	0,04	7,525	188,125	26,44	7,113291
8	36000	0,2249	0,04	6,247222	156,1806	32,18	4,853068
10	36000	0,1807	0,04	5,019444	125,4861	28,98	4,313585
12	36000	0,137	0,04	3,805556	95,13889	30,8	3,088621

Triplicata III:

Dia	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	36000	0,0602	0,04	1,672222	41,80556	10,87	3,858974
4	36000	0,107	0,04	2,972222	74,30556	16,78	4,317048
6	36000	0,2773	0,04	7,702778	192,5694	26,44	7,281342
8	36000	0,2203	0,04	6,119444	152,9861	32,18	4,753806
10	36000	0,1986	0,04	5,516667	137,9167	28,98	4,740885
12	36000	0,1356	0,04	3,766667	94,16667	30,8	3,057059

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	N°3	Média	Desvio padrão
2	4,282051	3,858974	4,294872	4,145299	0,248047
4	4,091109	4,317048	4,220217	4,209458	0,113353
6	7,160556	7,281342	7,113291	7,185063	0,086665
8	4,594123	4,753806	4,853068	4,733666	0,130642
10	4,423394	4,740885	4,313585	4,492622	0,221903
12	2,951099	3,057059	3,088621	3,032259	0,072037

Cálculo atividade de manganês peroxidase:

Triplicata I:

Dia	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	12000	0,001	0,07	0,083333	1,190476	10,87	0,10989
4	12000	0,0003	0,07	0,025	0,357143	16,78	0,020749
6	12000	0,0035	0,07	0,291667	4,166667	26,44	0,157548
8	12000	0,0013	0,07	0,108333	1,547619	32,18	0,04809
10	12000	0,006	0,07	0,5	7,142857	28,98	0,245536
12	12000	0,0004	0,07	0,033333	0,47619	30,8	0,015459

Triplicata II:

Dia	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	12000	0,0011	0,07	0,091667	1,309524	10,87	0,120879
4	12000	0,0001	0,07	0,008333	0,119048	16,78	0,006916
6	12000	0,0088	0,07	0,733333	10,47619	26,44	0,396121
8	12000	0,0063	0,07	0,525	7,5	32,18	0,233051
10	12000	0,0014	0,07	0,116667	1,666667	28,98	0,057292
12	12000	0,0002	0,07	0,016667	0,238095	30,8	0,00773

Triplicata III:

Dia	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	12000	0,0009	0,07	0,075	1,071429	10,87	0,098901
4	12000	0,0001	0,07	0,008333	0,119048	16,78	0,006916
6	12000	0,0044	0,07	0,366667	5,238095	26,44	0,19806
8	12000	0,001	0,07	0,083333	1,190476	32,18	0,036992
10	12000	0,0007	0,07	0,058333	0,833333	28,98	0,028646
12	12000	0,0007	0,07	0,058333	0,833333	30,8	0,027054

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	N°3	Média	Desvio padrão
2	0,120879	0,098901	0,10989	0,10989	0,010989
4	0,006916	0,006916	0,020749	0,011527	0,007986
6	0,396121	0,19806	0,157548	0,250576	0,127662
8	0,233051	0,036992	0,04809	0,106044	0,110131
10	0,057292	0,028646	0,245536	0,110491	0,117826
12	0,00773	0,027054	0,015459	0,016747	0,009726

Cálculo atividade de lignina peroxidase:

Triplicata I:

Dia	Coeficiente de extinção (Veratril álcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	9300	-	0,07	-	-	10,87	-
4	9300	-	0,07	-	-	16,78	-
6	9300	0,0107	0,07	1,150538	12,7381	26,44	0,481647
8	9300	0,0098	0,07	1,053763	11,66667	32,18	0,362524
10	9300	0,0025	0,07	0,268817	2,97619	28,98	0,102307
12	9300	0,0048	0,07	0,516129	5,714286	30,8	0,185511

Triplicata II:

Dia	Coeficiente de extinção (Veratril álcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	9300	-	0,07	-	-	10,87	-
4	9300	-	0,07	-	-	16,78	-
6	9300	0,0033	0,07	0,354839	3,928571	26,44	0,148545
8	9300	0,0165	0,07	1,774194	19,64286	32,18	0,610371
10	9300	0,0029	0,07	0,311828	3,452381	28,98	0,118676
12	9300	0,0002	0,07	0,021505	0,238095	30,8	0,00773

Triplicata III:

Dia	Coeficiente de extinção (Veratril álcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	9300	-	0,07	-	-	10,87	-
4	9300	-	0,07	-	-	16,78	-
6	9300	0,0086	0,07	0,924731	10,2381	26,44	0,387118
8	9300	0,0068	0,07	0,731183	8,095238	32,18	0,251547
10	9300	0,0024	0,07	0,258065	2,857143	28,98	0,098214
12	9300	0,0029	0,07	0,311828	3,452381	30,8	0,112079

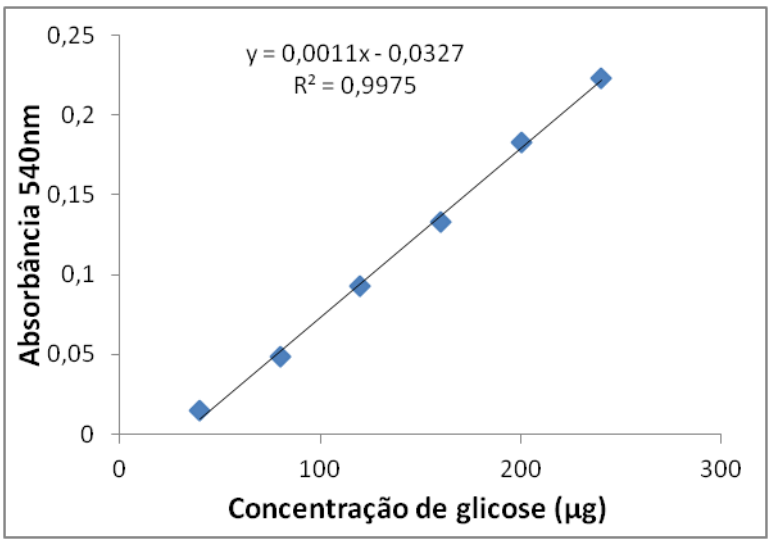
Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	N°3	Média	Desvio padrão
2	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
6	0,481647	0,387118	0,148545	0,339103	0,171663
8	0,362524	0,251547	0,610371	0,408147	0,183711
10	0,102307	0,098214	0,118676	0,106399	0,010827
12	0,185511	0,112079	0,00773	0,101773	0,089337

APÊNDICE IV - Curva padrão de glicose e atividade enzimática de endoglucanases e exoglucanases durante cultivo em bagaço de cana-de-açúcar

Curva padrão de glicose:

Concentração de glicose	Absorbância (540nm)
40	0,015
80	0,048
120	0,093
160	0,133
200	0,183
240	0,223



Cálculos para a atividade de endoglucanase e exoglucanase

Atividade de endoglucanase do fungo *Pestalotiopsis* sp. durante o 2° dia de cultivo em bagaço de cana de açúcar

Absorbância controle sobrenadante = 0.009

Absorbância controle substrato (CMC) = 0.002

Absorbância reação enzimática = 0.037

Absorbância corrigida = Reação enzimática – controle substrato – controle sobrenadante

= 0.019 - 0.002 – 0.009

= 0.008

Atividade enzimática

μmole/L da reação = Absorbância corrigida x inclinação da curva padrão de glicose

= 0.008 x 7296

= 75.984 μmole/L

μmole/L = 75.984 x (volume da reação / volume do extrato enzimático)

= 75.984 x (200/140)

= 542.74 μmole/L culture filtrate

(Foram utilizados 140 μL de extrato enzimático para 200 μL de volume inicial da reação)

Atividade enzimática (Unid/L) = 542.74 / tempo de incubação (tempo da reação)

= 542.74/60

= 9,04 μmole/L.min (U/L)

Dados utilizados na montagem da figura 10 B:

Atividade de endoglunacase do fungo *Pestalotiopsis* sp. durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar.

Duplicata I:

Dias	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,005	47,49	339,2143	5,653571429	10,87	0,520107767
4	0,003	28,494	203,5286	3,392142857	16,78	0,202153925
6	0,007	66,486	474,9	7,915	26,44	0,299357035
8	0,011	104,478	746,2714	12,43785714	32,18	0,386508923
10	0,011	104,478	746,2714	12,43785714	28,98	0,429187617
12	0,026	246,948	1763,914	29,39857143	30,8	0,954499072

Duplicata II:

Dias	Absorbância	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,008	75,984	542,7429	9,045714	10,87	0,832172
4	0,005	47,49	339,2143	5,653571	16,78	0,336923
6	0,01	94,98	678,4286	11,30714	26,44	0,427653
8	0,012	113,976	814,1143	13,56857	32,18	0,421646
10	0,013	123,474	881,9571	14,69929	28,98	0,507222
12	0,029	275,442	1967,443	32,79071	30,8	1,064634

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
2	0,520107767	0,832172	0,67614	0,220663
4	0,202153925	0,336923	0,269539	0,095296
6	0,299357035	0,427653	0,363505	0,090719
8	0,386508923	0,421646	0,404078	0,024846
10	0,429187617	0,507222	0,468205	0,055178
12	0,954499072	1,064634	1,009566	0,077877

Atividade enzimática de exoglucanase do fungo *Pestalotiopsis* sp. sob cultivo em bagaço de cana-de-açúcar.

Duplicata I:

Dias	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0	0	0	0	10,87	0
4	0	0	0	0	16,78	0
6	0	0	0	0	26,44	0
8	0,011	104,478	746,2714	12,43786	32,18	0,386509
10	0,009	85,482	610,5857	10,17643	28,98	0,351154
12	0	0	0	0	30,8	0

Duplicata II:

Dia	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0	0	0	0	10,87	0
4	0	0	0	0	16,78	0
6	0	0	0	0	26,44	0
8	0,009	85,482	610,5857	10,17643	32,18	0,316235
10	0,013	123,474	881,9571	14,69929	28,98	0,507222
12	0	0	0	0	30,8	0

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
6	0	0	0	0
8	0,386509	0,316235	0,351372	0,049691
10	0,351154	0,507222	0,429188	0,110357
12	0	0	0	0

Dados utilizados na montagem da figura 11:

Atividade enzimática de endoglucanases do fungo *Trichoderma reesei* durante cultivo em Avicel 1%.

Duplicata I:

Dias	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total na amostra (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,099	940,302	6716,443	111,9407143	19,87	5,633654
3	0,13	1234,74	8819,571	146,9928571	20,83	7,056786
4	0,117	1111,266	7937,614	132,2935714	28,28	4,677991
6	0,056	531,888	3799,2	63,32	30,07	2,105753
8	0,03	284,94	2035,286	33,92142857	31,65	1,071767
10	0,028	265,944	1899,6	31,66	34,02	0,930629

Duplicata II:

Dia	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade específica (U/L)	Proteína total na amostra (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,095	902,31	6445,071	107,4179	19,87	5,406032
3	0,132	1253,736	8955,257	149,2543	20,83	7,165352
4	0,117	1111,266	7937,614	132,2936	28,28	4,677991
6	0,06	569,88	4070,571	67,84286	30,07	2,256164
8	0,029	275,442	1967,443	32,79071	31,65	1,036042
10	0,03	284,94	2035,286	33,92143	34,02	0,997103

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
2	5,633654	5,406032	5,519843	0,160953
3	7,056786	7,165352	7,111069	0,076768
4	4,677991	4,677991	4,677991	0
6	2,105753	2,256164	2,180959	0,106357
8	1,071767	1,036042	1,053904	0,025262
10	0,930629	0,997103	0,963866	0,047004

Atividade enzimática de exoglucanase do fungo *Tricoderma reesei* durante cultivo em Avicel 1%.

Duplicata I:

Dias	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total na amostra (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,024	227,952	1628,229	27,13714286	19,87	1,365734
3	0,039	370,422	2645,871	44,09785714	20,83	2,117036
4	0,014	132,972	949,8	15,83	28,28	0,55976
6	0,011	104,478	746,2714	12,43785714	30,07	0,41363
8	0,014	132,972	949,8	15,83	31,65	0,500158
10	0,019	180,462	1289,014	21,48357143	34,02	0,631498

Duplicata II:

Dia	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade específica (U/L)	Proteína total na amostra (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,025	237,45	1696,071	28,26786	19,87	1,42264
3	0,041	389,418	2781,557	46,35929	20,83	2,225602
4	0,016	151,968	1085,486	18,09143	28,28	0,639725
6	0,011	104,478	746,2714	12,43786	30,07	0,41363
8	0,012	113,976	814,1143	13,56857	31,65	0,428707
10	0,016	151,968	1085,486	18,09143	34,02	0,531788

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
2	1,365734	1,42264	1,394187	0,040238
3	2,117036	2,225602	2,171319	0,076768
4	0,55976	0,639725	0,599742	0,056544
6	0,41363	0,41363	0,41363	0
8	0,500158	0,428707	0,464432	0,050524
10	0,631498	0,531788	0,581643	0,070506

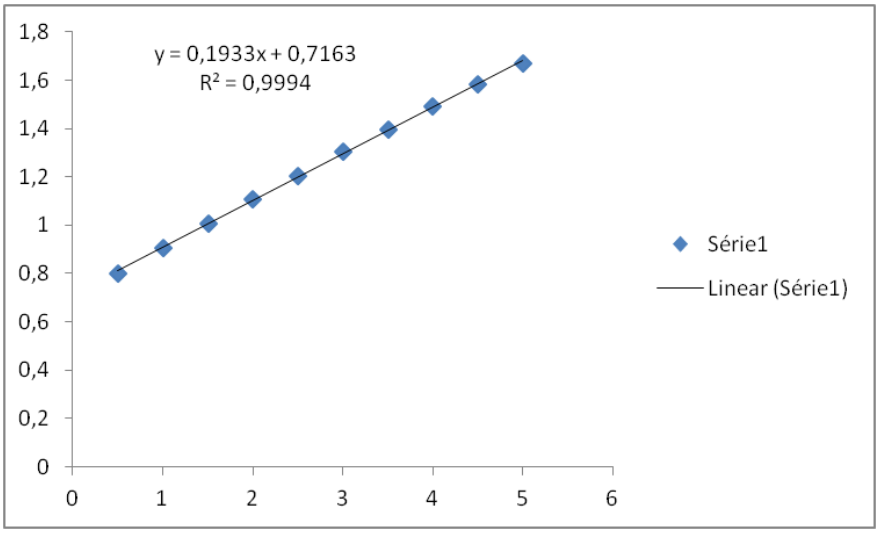
Apêndice V - Atividade enzimática de oxidorredutases e celulases após a purificação do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp. por cromatografia de troca iônica

Dados utilizados na montagem da figura 12 B:

Lacase

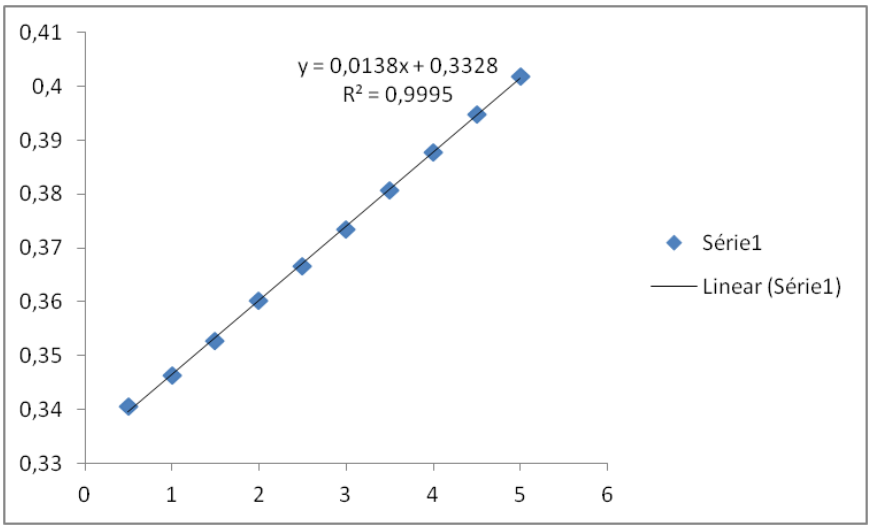
Fração 20

N°1	0,8046	0,912	1,0155	1,117	1,2164	1,3133	1,4065	1,4986	1,5878	1,6751
N°2	0,8394	0,9471	1,0518	1,1536	1,254	1,3547	1,4532	1,5488	1,6437	1,736
N°3	0,76	0,8579	0,9588	1,0548	1,1503	1,2449	1,3372	1,4277	1,5159	1,6027
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,801333	0,905667	1,0087	1,108467	1,2069	1,3043	1,398967	1,4917	1,582467	1,671267



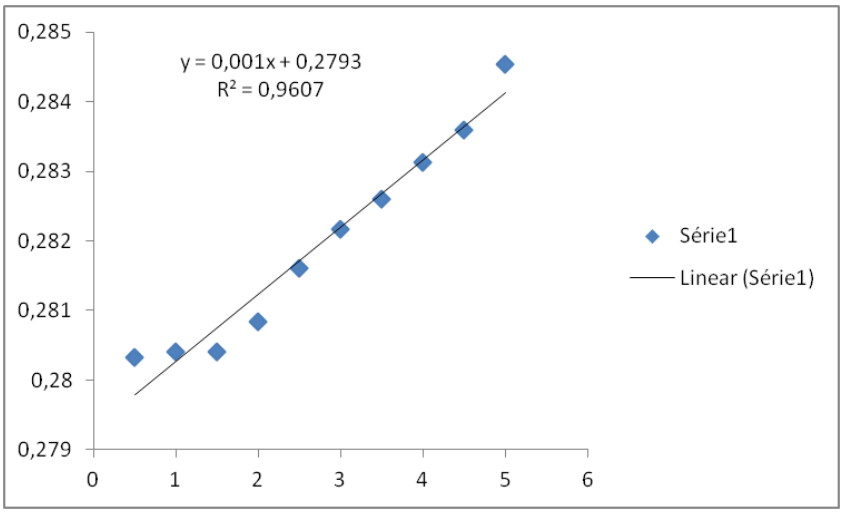
Fração 21/22

N°1	0,3443	0,3504	0,3576	0,3652	0,3714	0,3788	0,386	0,393	0,4006	0,4073
N°2	0,3407	0,3475	0,3532	0,3606	0,3665	0,373	0,3805	0,3875	0,395	0,4025
N°3	0,337	0,3414	0,3477	0,3549	0,362	0,369	0,3759	0,3832	0,3892	0,396
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,340667	0,346433	0,352833	0,360233	0,366633	0,3736	0,3808	0,3879	0,394933	0,401933



Fração 23

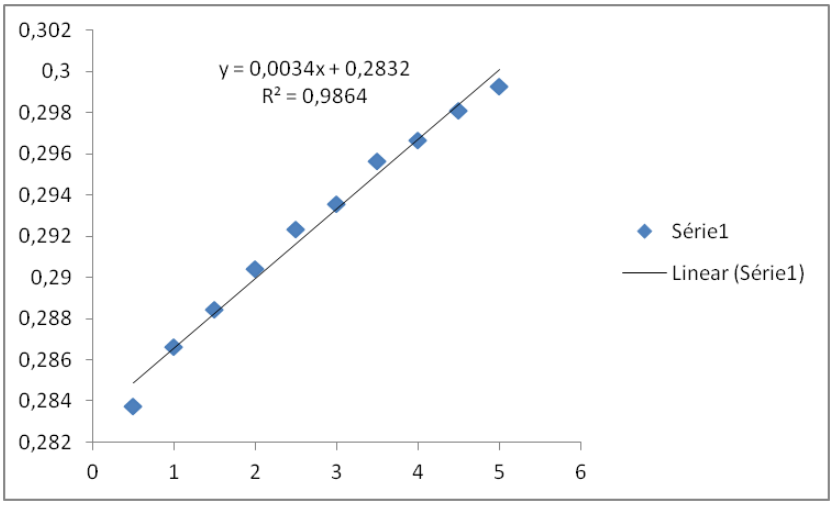
N°1	0,2826	0,2824	0,2831	0,2836	0,2849	0,2849	0,2856	0,2865	0,287	0,2882
N°2	0,2796	0,2804	0,2801	0,2802	0,2815	0,2824	0,283	0,2835	0,2842	0,2851
N°3	0,2788	0,2784	0,278	0,2787	0,2784	0,2792	0,2792	0,2794	0,2796	0,2803
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,280333	0,2804	0,2804	0,280833	0,2816	0,282167	0,2826	0,283133	0,2836	0,284533



Manganês peroxidase

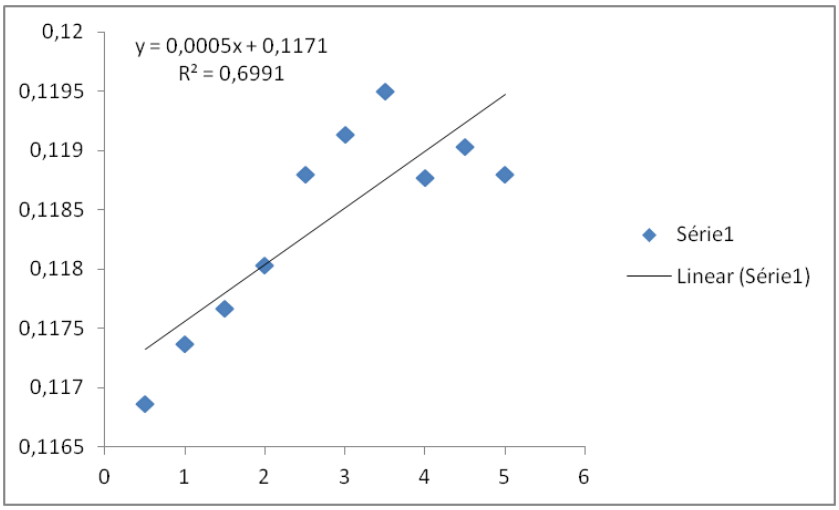
Fração 20

N°1	0,295	0,2987	0,3012	0,3044	0,3069	0,3094	0,3126	0,3144	0,3165	0,3189
N°2	0,2935	0,2965	0,2988	0,3013	0,304	0,3052	0,3074	0,309	0,3113	0,3129
N°3	0,2627	0,2647	0,2654	0,2656	0,2661	0,2661	0,2669	0,2666	0,2665	0,2661
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,283733	0,286633	0,288467	0,290433	0,292333	0,293567	0,295633	0,296667	0,2981	0,2993



Fração 21

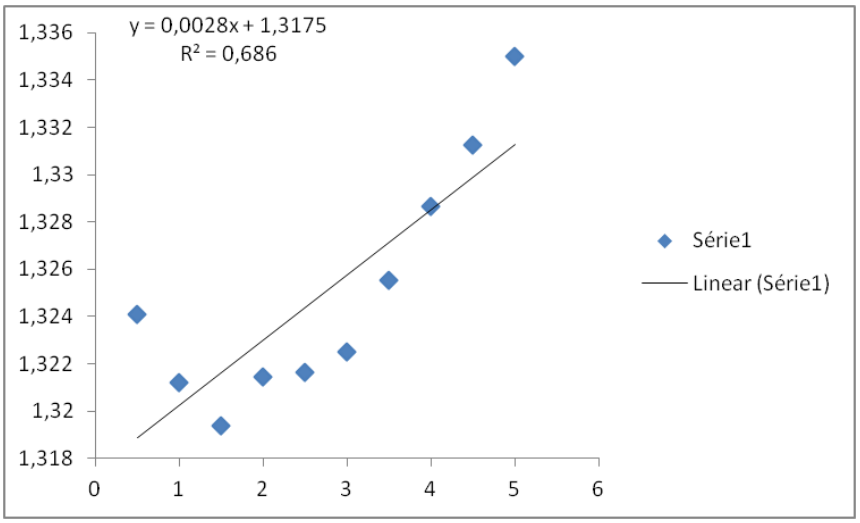
N°1	0,1184	0,119	0,1194	0,1198	0,1203	0,1205	0,1213	0,1209	0,1214	0,1213
N°2	0,1187	0,1192	0,1195	0,1203	0,1218	0,1228	0,1229	0,1217	0,1217	0,122
N°3	0,1135	0,1139	0,1141	0,114	0,1143	0,1141	0,1143	0,1137	0,114	0,1131
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,116867	0,117367	0,117667	0,118033	0,1188	0,119133	0,1195	0,118767	0,119033	0,1188



Lignina peroxidase

Fração 20

N°1	1,3588	1,3565	1,3532	1,3548	1,3551	1,3576	1,3594	1,3635	1,3661	1,37
N°2	1,2894	1,2859	1,2856	1,2881	1,2882	1,2874	1,2917	1,2938	1,2964	1,3
N°3	1,3373	1,3333	1,33	1,33	1,3277	1,3276	1,3252	1,3277	1,3304	1,337
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	1,3241	1,3212	1,3194	1,32145	1,32165	1,3225	1,32555	1,32865	1,33125	1,335



Cálculo atividade de lacase:

Triplicata I:

Fração	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	36000	0,1933	0,01	5,369444	536,9444	101,06	5,313093
21/22	36000	0,0141	0,04	0,391667	9,791667	13,33	0,734375
23	36000	0,0013	0,04	0,036111	0,902778	1,21	0,744792

Triplicata II:

Fração	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	36000	0,1876	0,01	5,211111	521,1111	101,06	5,156422
21/22	36000	0,0135	0,04	0,375	9,375	13,33	0,703125
23	36000	0,0004	0,04	0,011111	0,277778	1,21	0,229167

Triplicata III:

Fração	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	36000	0,1922	0,01	5,338889	533,8889	101,06	5,282859
21/22	36000	0,0137	0,04	0,380556	9,513889	13,33	0,713542
23	36000	0,0012	0,04	0,033333	0,833333	1,21	0,6875

Média e desvio padrão:

Fração	N°1	N°2	N°3	Média	Desvio padrão
20	5,313093	5,282859	5,156422	5,250791	0,083113
21/22	0,734375	0,713542	0,703125	0,717014	0,015912
23	0,744792	0,6875	0,229167	0,553819	0,282613

Cálculo manganês peroxidase:

Triplicata I:

Fração	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	12000	0,0052	0,07	0,433333	6,190476	101,06	0,061255
21/22	12000	0,0007	0,07	0,058333	0,833333	13,33	0,0625
23	12000	0	0,07	0	0	1,21	0

Triplicata II:

Fração	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	12000	0,0006	0,07	0,05	0,714286	101,06	0,007068
21/22	12000	0	0,07	0	0	13,33	0
23	12000	0	0,07	0	0	1,21	0

Triplicata III:

Fração	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	12000	0,0042	0,07	0,35	5	101,06	0,049475
21/22	12000	0,0008	0,07	0,066667	0,952381	13,33	0,071429
23	12000	0	0,07	0	0	1,21	0

Média e desvio padrão:

Fração	N°1	N°2	N°3	Média	Desvio padrão
20	0,061255	0,049475	0,007068	0,039266	0,0285
21/22	0,0625	0,071429	0	0,044643	0,038919
23	0	0	0	0	0

Cálculo lignina peroxidase:

Triplicata I:

Fração	Coeficiente de extinção (Veratril alcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	9300	0,0027	0,07	0,290323	4,147465	101,06	0,041039
21/22	9300	0	0,07	0	0	13,33	0
23	9300	0	0,07	0	0	1,21	0

Triplicata II:

Fração	Coeficiente de extinção (Veratril alcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	9300	0	0,07	0	0	101,06	0
21/22	9300	0	0,07	0	0	13,33	0
23	9300	0	0,07	0	0	1,21	0

Triplicata III:

Fração	Coeficiente de extinção (Veratril alcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	9300	0,0024	0,07	0,258065	3,686636	101,06	0,036479
21/22	9300	0	0,07	0	0	13,33	0
23	9300	0	0,07	0	0	1,21	0

Média e desvio padrão:

Fração	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
20	0,041039	0,036479	0,02584	0,022494
21/22	0	0	0	0
23	0	0	0	0

Atividade enzimática de endoglucanase

Duplicata 1:

Fração	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	0,033	313,434	2238,814	37,31357	101,06	0,3692
21/22	0	0	0	0	13,33	0
23	0	0	0	0	1,21	0

Duplicata 2

Fração	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	0,04	379,92	2713,714	45,22857	101,06	0,4475
21/22	0	0	0	0	13,33	0
23	0	0	0	0	1,21	0

Média e desvio padrão:

Fração	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
20	0,36922	0,447539	0,4083	0,022494
21/22	0	0	0	0
23	0	0	0	0

Atividade enzimática de exoglunase:

Duplicata 1:

Fração	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	0	0	0	0	101,06	0
21/22	0,041	389,418	2781,557	46,35929	13,33	3,47
23	0	0	0	0	1,21	0

Duplicata 2:

Fração	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
20	0	0	0	0	101,06	0
21/22	0,04	379,92	2713,714	45,22857	13,33	3,39
23	0	0	0	0	1,21	0

Média e desvio padrão:

Fração	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
20	0	0	0	0
21/22	3,392143	3,476946	3,448679	0,048961
23	0	0	0	0

Apêndice VI - Atividade específica de enzimas oxidorredutases e celulases do fungo *Pestalotiopsis sp.* e celulases do fungo *T. reesei* a serem utilizados na preparação do coquetel enzimático para o ensaio final de sacarificação do bagaço de cana de açúcar

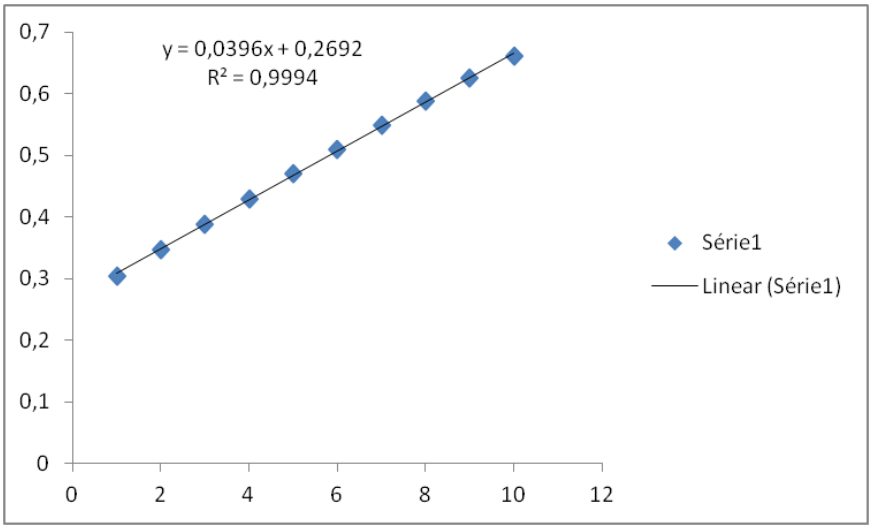
Pestalotiopsis sp.

Dados utilizados na montagem da figura 14 A:

Atividade enzimática de lacase:

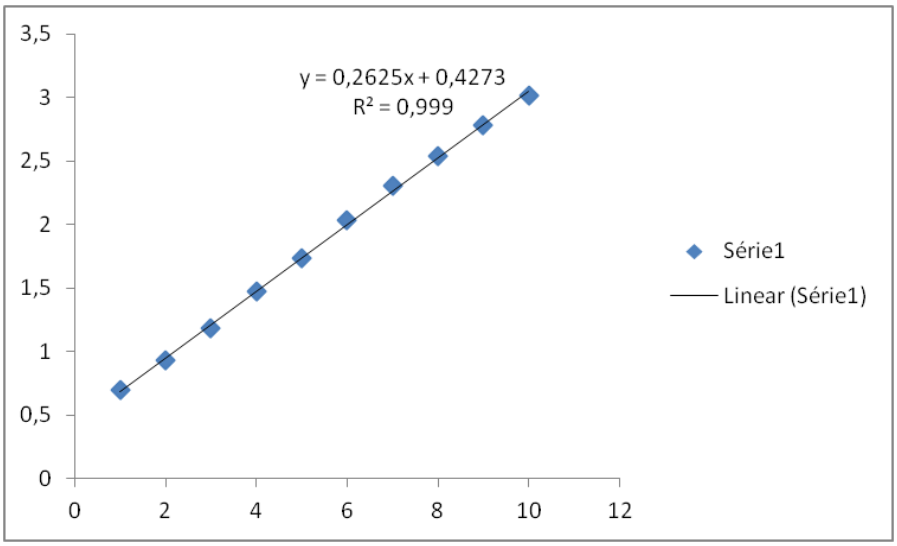
2 dias:

N°1	0,3115	0,3551	0,3966	0,4379	0,4793	0,5192	0,5584	0,5958	0,6329	0,6691
N°2	0,3009	0,3425	0,3839	0,4244	0,4631	0,5024	0,5409	0,5789	0,6155	0,651
N°3	0,3005	0,3433	0,386	0,4279	0,4683	0,5083	0,5483	0,5872	0,6254	0,6617
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,3043	0,346967	0,388833	0,430067	0,470233	0,509967	0,5492	0,5873	0,6246	0,6606



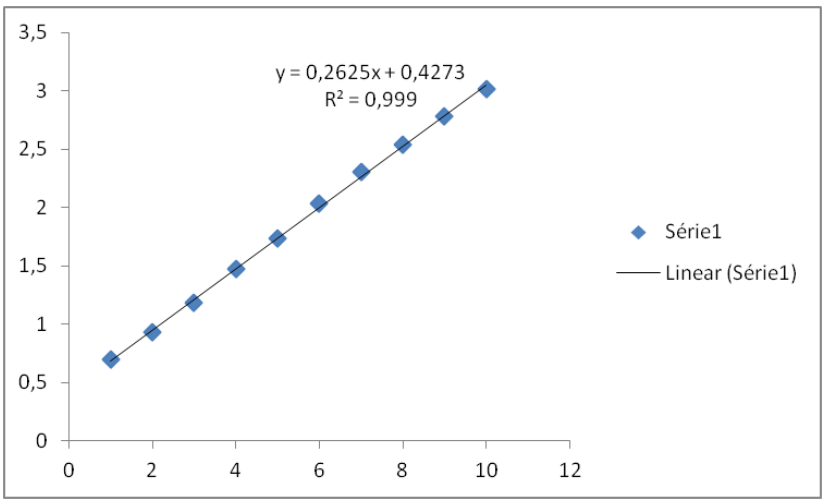
8 dias:

N°1	0,6619	0,9518	1,1283	1,4196	1,6738	2,0235	2,2523	2,5286	2,7912	3,0282
N°2	0,596	0,8087	1,1121	1,4803	1,7074	1,9459	2,1995	2,4488	2,6838	2,8957
N°3	0,8361	1,048	1,3255	1,5348	1,8222	2,1263	2,474	2,6322	2,8832	3,117
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,698	0,936167	1,188633	1,478233	1,734467	2,0319	2,3086	2,536533	2,786067	3,013633



8 dias, sobrenadante concentrado 5x por ultrafiltração:

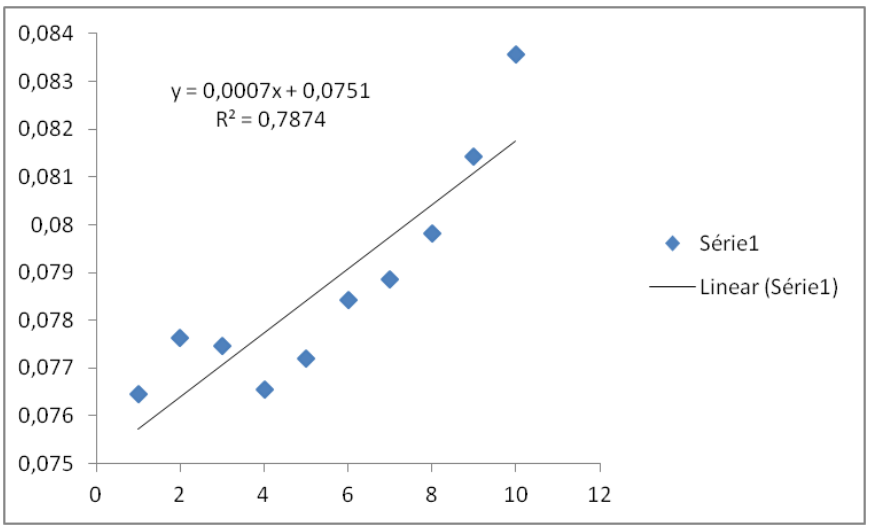
N°1	0,6619	0,9518	1,1283	1,4196	1,6738	2,0235	2,2523	2,5286	2,7912	3,0282
N°2	0,596	0,8087	1,1121	1,4803	1,7074	1,9459	2,1995	2,4488	2,6838	2,8957
N°3	0,8361	1,048	1,3255	1,5348	1,8222	2,1263	2,474	2,6322	2,8832	3,117
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,698	0,936167	1,188633	1,478233	1,734467	2,0319	2,3086	2,536533	2,786067	3,013633



Manganês peroxidase:

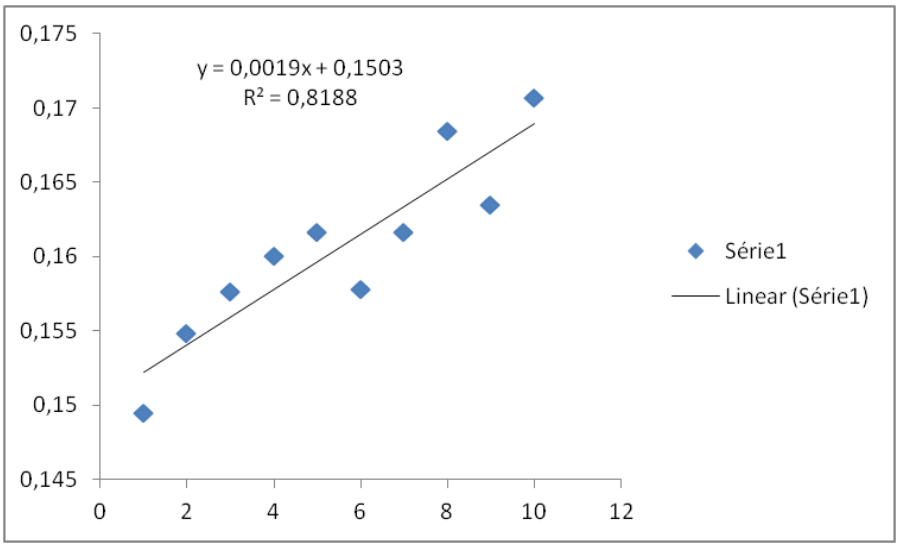
2 dias:

N°1	0,0791	0,0796	0,0799	0,0784	0,0776	0,0791	0,0809	0,0797	0,0793	0,0793
N°2	0,0757	0,0781	0,0769	0,0766	0,0761	0,0757	0,0762	0,0777	0,0798	0,0834
N°3	0,0746	0,0752	0,0756	0,0747	0,0779	0,0805	0,0795	0,0821	0,0852	0,088
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,076467	0,077633	0,077467	0,076567	0,0772	0,078433	0,078867	0,079833	0,081433	0,083567



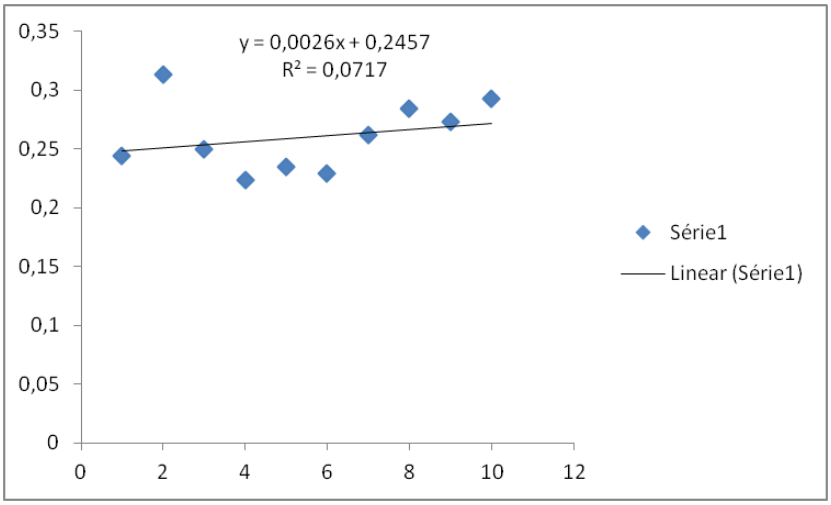
8 dias:

N°1	0,1574	0,1664	0,1702	0,1686	0,1757	0,1649	0,1624	0,1759	0,1637	0,1774
N°2	0,1381	0,1464	0,1509	0,1562	0,1541	0,1555	0,1632	0,1668	0,1586	0,1607
N°3	0,1529	0,1516	0,1518	0,1553	0,155	0,1529	0,1592	0,1626	0,1682	0,174
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,149467	0,1548	0,157633	0,160033	0,1616	0,157767	0,1616	0,168433	0,1635	0,1707



8 dias, sobrenadante concentrado 5X por ultrafiltração:

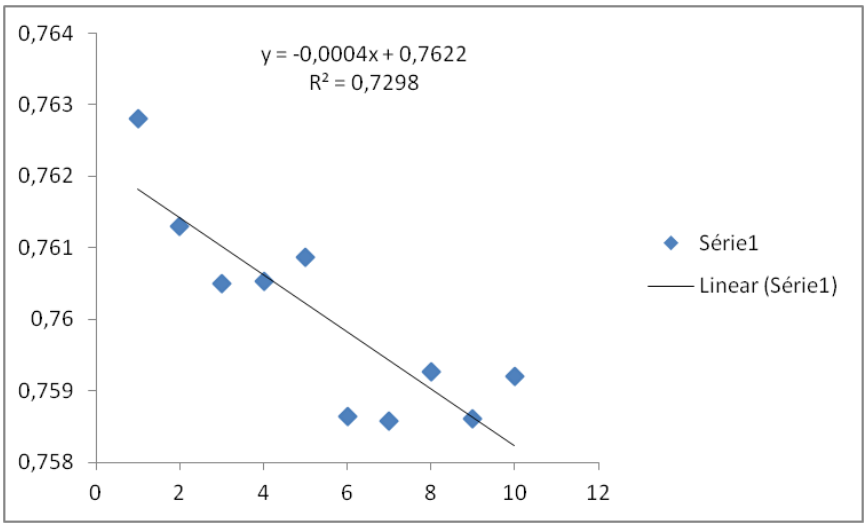
N°1	0,2885	0,3237	0,3251	0,2864	0,2455	0,2519	0,2724	0,2562	0,2743	0,2821
N°2	0,2235	0,2858	0,2576	0,2003	0,2317	0,2012	0,2424	0,2876	0,2697	0,274
N°3	0,2636	0,3405	0,2405	0,2464	0,2365	0,2563	0,281	0,28	0,2755	0,3095
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,24355	0,31315	0,24905	0,22335	0,2341	0,22875	0,2617	0,2838	0,2726	0,29175



Lignina peroxidase

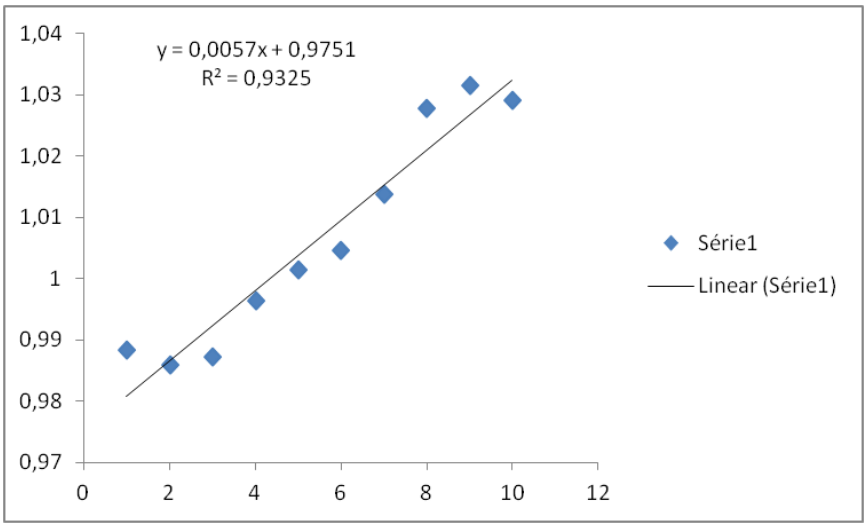
2 dias:

N°1	0,7822	0,7836	0,7831	0,7842	0,7859	0,7826	0,7818	0,7844	0,7837	0,783
N°2	0,7549	0,7551	0,7538	0,7549	0,7547	0,7526	0,7516	0,7523	0,7503	0,7514
N°3	0,7513	0,7452	0,7446	0,7425	0,742	0,7407	0,7423	0,7411	0,7418	0,7432
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,7628	0,7613	0,7605	0,760533	0,760867	0,758633	0,758567	0,759267	0,7586	0,7592



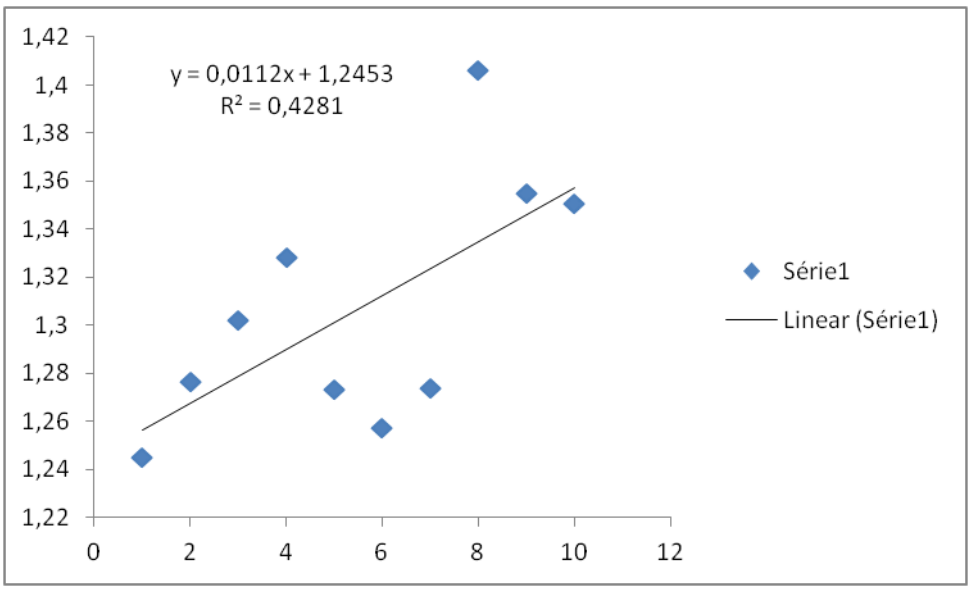
8 dias:

N°1	0,9892	0,9735	0,97	0,9785	0,981	0,9771	0,9863	0,994	0,9815	0,9918
N°2	0,9944	0,9989	1,0032	1,0105	1,0166	1,0246	1,0329	1,0422	1,0528	1,0133
N°3	0,981	0,9852	0,9884	1,0001	1,0065	1,012	1,0219	1,0467	1,0601	1,0817
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	0,9882	0,985867	0,9872	0,996367	1,001367	1,004567	1,0137	1,027633	1,031467	1,028933



8 dias, sobrenadante concentrado 5x por ultrafiltração:

N°1	1,1934	1,2659	1,5025	1,3432	1,3174	1,2976	1,3128	1,4834	1,3703	1,4764
N°2	1,2287	1,2457	1,1156	1,2513	1,1549	1,1979	1,2257	1,2721	1,3193	1,3308
N°3	1,3124	1,3181	1,2884	1,3895	1,347	1,2757	1,2831	1,463	1,3759	1,2444
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Média:	1,244833	1,276567	1,302167	1,328	1,2731	1,257067	1,273867	1,406167	1,355167	1,350533



Cálculo atividade enzimática de Oxidorredutases:

Lacase:

Triplicata I:

Dia	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	36000	0,0398	0,04	1,105556	27,63889	21,01	1,315189
8 dias	36000	0,2668	0,02	7,411111	370,5556	50,06	7,402228
Concentrado	36000	0,3714	0,02	10,31	515,8333	67,37	7,656722

Triplicata II:

Dia	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	36000	0,0389	0,04	1,080556	27,01389	21,01	1,285448
8 dias	36000	0,26	0,02	7,222222	361,1111	50,06	7,213566
Concentrado	36000	0,3855	0,02	10,70833	535,4167	67,37	7,947405

Triplicata III:

Dia	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	36000	0,0402	0,04	1,116667	27,91667	21,01	1,328407
8 dias	36000	0,2608	0,02	7,244444	362,2222	50,06	7,235762
Concentrado	36000	0,3226	0,02	8,961111	448,0556	67,37	6,650669

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	N°3	Média	Desvio padrão
2	1,315189	1,285448	1,328407	1,309681	0,022002
8	7,402228	7,213566	7,235762	7,283852	0,103116
Concentrado	7,656722	7,947405	6,650669	7,418265	0,680461

Manganês peroxidase:

Triplicata I:

Dia	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	12000	0	0,07	0	0	21,01	0
8 dias	12000	0,001	0,07	0,083333	1,190476	50,06	0,023781
Concentrado	12000	0	0,07	0	0	67,37	0

Triplicata II:

Dia	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	12000	0,0005	0,07	0,041667	0,595238	21,01	0,028324
8 dias	12000	0,0005	0,07	0,041667	0,595238	50,06	0,01189
Concentrado	12000	0,0036	0,07	0,3	4,285714	67,37	0,063615

Triplicata III:

Dia	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	12000	0,0015	0,07	0,125	1,785714	21,01	0,084973
8 dias	12000	0,0022	0,07	0,183333	2,619048	50,06	0,052318
Concentrado	12000	0,0017	0,07	0,141667	2,02381	67,37	0,03004

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	N°3	Média	Desvio padrão
2	0	0,028324	0,084973	0,037766	0,043266
8	0,023781	0,01189	0,052318	0,02933	0,020777
Concentrado	0	0,063615	0,03004	0,031218	0,031824

Lignina peroxidase:

Triplicata I:

Dia	Coeficiente de extinção (Veratril álcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	9300	0	0,07	0	0	21,01	0
8 dias	9300	0,0013	0,07	0,139785	1,996928	50,06	0,039891
Concentrado	9300	0,0186	0,07	2	28,57143	67,37	0,424097

Triplicata II:

Dia	Coeficiente de extinção (Veratril álcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	9300	0	0,07	0	0	21,01	0
8 dias	9300	0,005	0,07	0,537634	7,680492	50,06	0,153426
Concentrado	9300	0,0132	0,07	1,419355	20,2765	67,37	0,300972

Triplicata III:

Dia	Coeficiente de extinção (Veratril álcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2 dias	9300	0	0,07	0	0	21,01	0
8 dias	9300	0,0017	0,07	0,182796	2,611367	50,06	0,038762
Concentrado	9300	0,0109	0,07	1,172043	16,74347	67,37	0,334468

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	N°3	Média	Desvio padrão
2	0	0	0	0	0
8	0,039891	0,153426	0,334468	0,175928	0,148572
Concentrado	0,424097	0,300972	0,038762	0,25461	0,196807

Dados utilizados na montagem da figura 14 B:

Endoglucanase:

2 dias

Duplicata I:

Dia	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0	0	0	0	21,01	0
8	0,014	132,972	949,8	15,83	50,06	0,316
Concentrado	0,032	303,936	2170,971	36,18285714	67,37	0,537

Duplicata II:

Dia	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0	0	0	0	21,01	0
8	0,015	142,47	1017,643	16,96071429	50,06	0,338
Concentrado	0,034	322,932	2306,657	38,44428571	67,37	0,570

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
2	0	0	0	0
8	0,316221	0,338808	0,327514	0,015972
Concentrado	0,537077	0,570644	0,55386	0,023736

Exoglucanase:

Duplicata I:

Dia	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0	0	0	0	21,01	0
8	0,003	28,494	203,5286	3,392143	50,06	0,067
Concentrado	0,033	313,434	2238,814	37,31357	67,37	0,553

Duplicata II:

Dia	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0	0	0	0	21,01	0
8	0,012	113,976	814,1143	13,56857	50,06	0,271
Concentrado	0,036	341,928	2442,343	40,70571	67,37	0,604

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
2	0	0	0	0
8	0,338808	0,271046	0,304927	0,047915
concentrado	0,570644	0,604211	0,587428	0,023736

T. reesei:

Dados utilizados na montagem da figura 14 C:

Endoglucanase:

Duplicata I:

Dias	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,109	1035,282	7394,871	123,2478571	21,01	4,84
3	0,122	1158,756	8276,829	137,9471429	25,90	5,32
Concentrado	0,137	1301,226	9294,471	154,9078571	31,98	5,86

Duplicata II:

Dias	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,112	1063,776	7598,4	126,64	21,01	4,98
3	0,12	1139,76	8141,143	135,6857143	25,90	5,23
Concentrado	0,141	1339,218	9565,843	159,4307143	31,98	6,02

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
2	4,84272	4,984113	4,913416	0,09998
8	5,324276	5,236992	5,280634	0,061719
Concentrado	5,864714	6,026128	5,945421	0,114137

Exoglucanase:

Duplicata I:

Dias	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,024	227,952	1628,229	27,13714	21,01	1,291
3	0,039	370,422	2645,871	44,09786	25,90	1,70
Concentrado	0,044	417,912	2985,086	49,75143	31,98	1,55

Duplicata II:

Dias	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)	Proteína total (µg/mL)	Atividade específica (U/mg)
2	0,025	237,45	1696,071	28,26786	21,01	1,34
3	0,041	389,418	2781,557	46,35929	25,90	1,78
Concentrado	0,045	427,41	3052,929	50,88214	31,98	1,59

Média e desvio padrão:

Dia	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
2	1,291313	1,345118	1,318216	0,038046
8	1,702023	1,789306	1,745664	0,061719
concentrado	1,555326	1,590674	1,573	0,024995

Apêndice VII - Ensaios de sacarificação do bagaço de cana-de-açucar

Dados utilizados na montagem da figura 15:

Açúcares redutores liberados da amostra controle após 24H:

Duplicata I:

Horas	Absorbância (540nm)	Açúcares redutores (g/L)
0	0,004	0,3336
2	0,255	2,615
4	0,543	5,233
6	0,858	8,09
24	1,32	12,297

Duplicata II:

Horas	Absorbância (540nm)	Açúcares redutores (g/L)
0	0,004	0,333
2	0,223	2,324
4	0,512	4,95
6	0,802	7,588
24	1,316	12,26

Média e desvio padrão:

Horas	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
0	0,333636	0,333636	0,333636	0
2	2,615455	2,324545	2,47	0,205704
4	5,233636	4,951818	5,092727	0,199276
6	8,097273	7,588182	7,842727	0,359982
24	12,29727	12,26091	12,27909	0,025713

Açúcares redutores liberados pelo coquetel enzimático após 24h:

Duplicata I:

Horas	Absorbância (540nm)	Açúcares redutores (g/L)
0	0,007	0,360
2	0,274	2,788
4	0,581	5,579
6	1,133	10,59
24	1,653	15,32

Duplicata II:

Horas	Absorbância (540nm)	Açúcares redutores (g/L)
0	0,007	0,360
2	0,282	2,86
4	0,615	5,888
6	1,151	10,76
24	1,68	15,57

Média e desvio padrão:

Horas	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
0	0,360909	0,360909	0,360909	0
2	2,860909	2,788182	2,824545	0,051426
4	5,888182	5,579091	5,733636	0,21856
6	10,76091	10,59727	10,67909	0,115708
24	15,57	15,32455	15,44727	0,173563

Atividade enzimática de celulases na amostra controle:

Dados utilizados na montagem da figura 16 A:

Endoglucanases:

Duplicata I:

Horas	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)
0	0,139	1320,222	9430,157	157,1693
2	0,174	1652,652	11804,66	196,7443
4	0,189	1795,122	12822,3	213,705
6	0,231	2194,038	15671,7	261,195
24	0,243	2308,014	16485,81	274,7636

Duplicata II:

Horas	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)
0	0,137	1301,226	9294,471	154,9079
2	0,175	1662,15	11872,5	197,875
4	0,187	1776,126	12686,61	211,4436
6	0,227	2156,046	15400,33	256,6721
24	0,242	2298,516	16417,97	273,6329

Média e desvio padrão:

Horas	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
0	154,9079	157,1693	156,0386	0,001414
2	197,875	196,7443	197,3096	0,000707
4	211,4436	213,705	212,5743	0,001414
6	256,6721	261,195	258,9336	0,002828
24	273,6329	274,7636	274,1982	0,000707

Dados utilizados na montagem da figura 16 B:

Exoglucanases:

Duplicata I:

Horas	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)
0	0,026	246,948	1763,914	29,39857
2	0,044	417,912	2985,086	49,75143
4	0,083	788,334	5630,957	93,84929
6	0,091	864,318	6173,7	102,895
24	0,077	731,346	5223,9	87,065

Duplicata II:

Horas	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)
0	0,025	237,45	1696,071	28,26786
2	0,046	436,908	3120,771	52,01286
4	0,082	778,836	5563,114	92,71857
6	0,092	873,816	6241,543	104,0257
24	0,075	712,35	5088,214	84,80357

Média e desvio padrão:

Horas	N°1	N°2	Média	Desvio padrão
0	29,39857	28,26786	28,83321	0,000707
2	49,75143	52,01286	50,88214	0,001414
4	93,84929	92,71857	93,28393	0,000707
6	102,895	104,0257	103,4604	0,000707
24	87,065	84,80357	85,93429	0,001414

Atividade de celulases no coquetel enzimático:

Dados utilizados na montagem da figura 16 A:

Endoglucanase:

Duplicata I:

Horas	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)
0	0,164	1557,672	11126,23	185,4371
2	0,195	1852,11	13229,36	220,4893
4	0,251	2383,998	17028,56	283,8093
6	0,225	2137,05	15264,64	254,4107
24	0,255	2421,99	17299,93	288,3321

Duplicata II:

Horas	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)
0	0,161	1529,178	10922,7	182,045
2	0,197	1871,106	13365,04	222,7507
4	0,253	2402,994	17164,24	286,0707
6	0,223	2118,054	15128,96	252,1493
24	0,251	2383,998	17028,56	283,8093

Média e desvio padrão:

Horas	N°1	N°2	Média	Desvipad
0	185,4371	182,045	183,7411	0,002121
2	220,4893	222,7507	221,62	0,001414
4	283,8093	286,0707	284,94	0,001414
6	254,4107	252,1493	253,28	0,001414
24	288,3321	283,8093	286,0707	0,002828

Dados utilizados na montagem da figura 16 B:

Exoglucanase:

Duplicata I:

Horas	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)
0	0,063	598,374	4274,1	71,235
2	0,166	1576,668	11261,91	187,6986
4	0,137	1301,226	9294,471	154,9079
6	0,144	1367,712	9769,371	162,8229
24	0,042	398,916	2849,4	47,49

Duplicata II:

Horas	Absorbância (540nm)	µmol/L	µmole/L	Atividade enzimática (U/L)
0	0,06	569,88	4070,571	67,84286
2	0,17	1614,66	11533,29	192,2214
4	0,138	1310,724	9362,314	156,0386
6	0,142	1348,716	9633,686	160,5614
24	0,044	417,912	2985,086	49,75143

Média e desvio padrão:

Horas	N°1	N°2	Média	Desvipad
0	71,235	67,84286	69,53893	0,002121
2	187,6986	192,2214	189,96	0,002828
4	154,9079	156,0386	155,4732	0,000707
6	162,8229	160,5614	161,6921	0,001414
24	47,49	49,75143	48,62071	0,001414

Dados utilizados na montagem da figura 16 C:

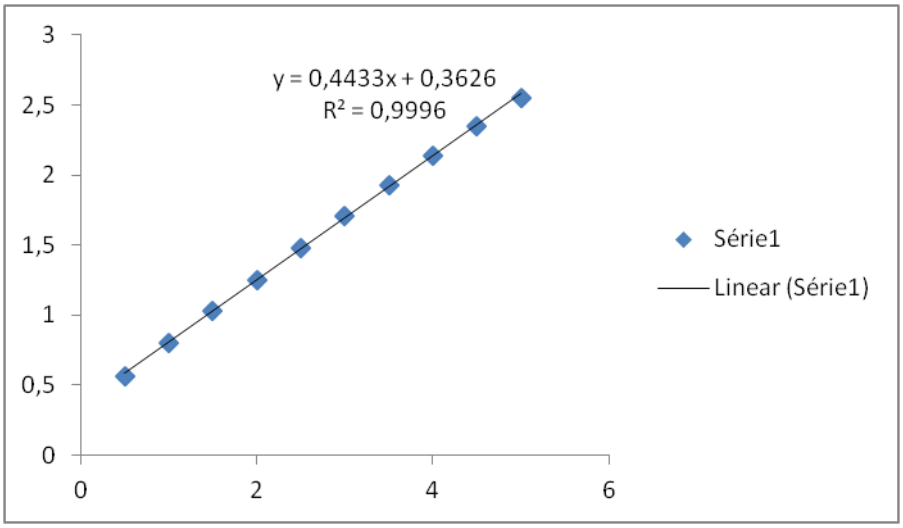
Atividade de enzimas oxidorredutases no coquetel enzimático:

Lacase:

0 horas:

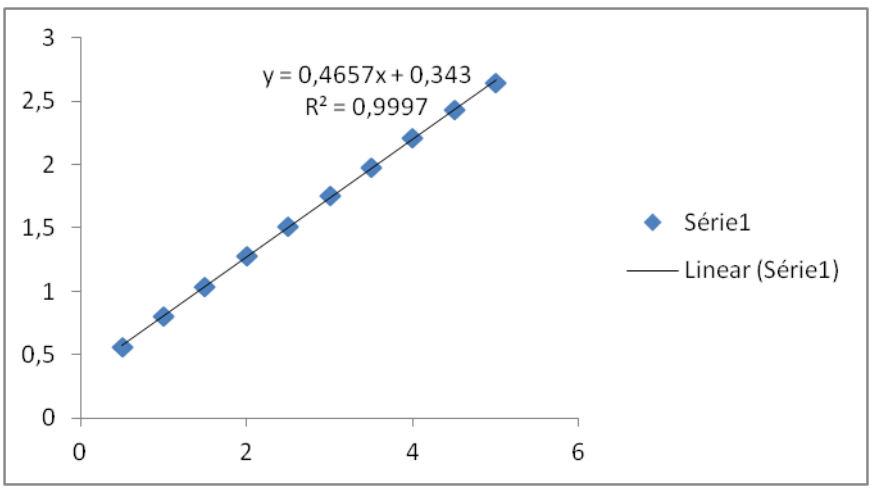
Duplicata I

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,5623	0,8012	1,0312	1,2565	1,4836	1,7073	1,927	2,1411	2,3518	2,5548



Duplicata II:

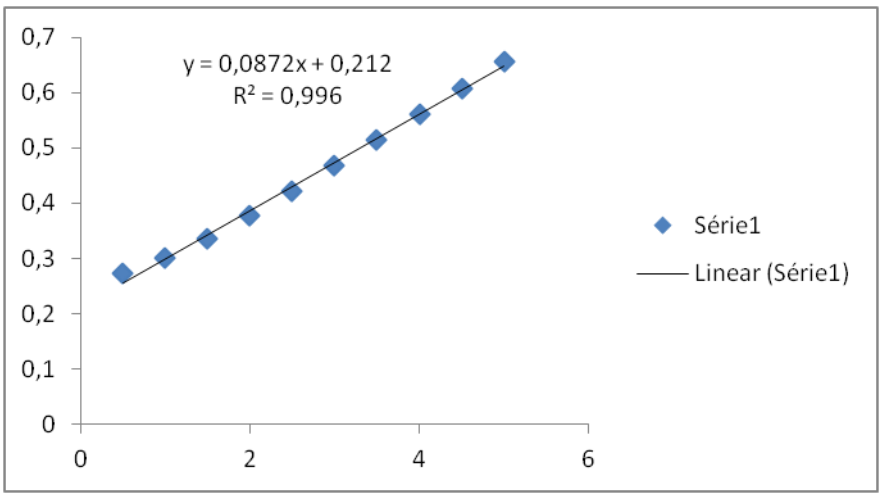
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,5593	0,803	1,0421	1,2811	1,5187	1,7534	1,9844	2,2111	2,4337	2,6499



2 Horas:

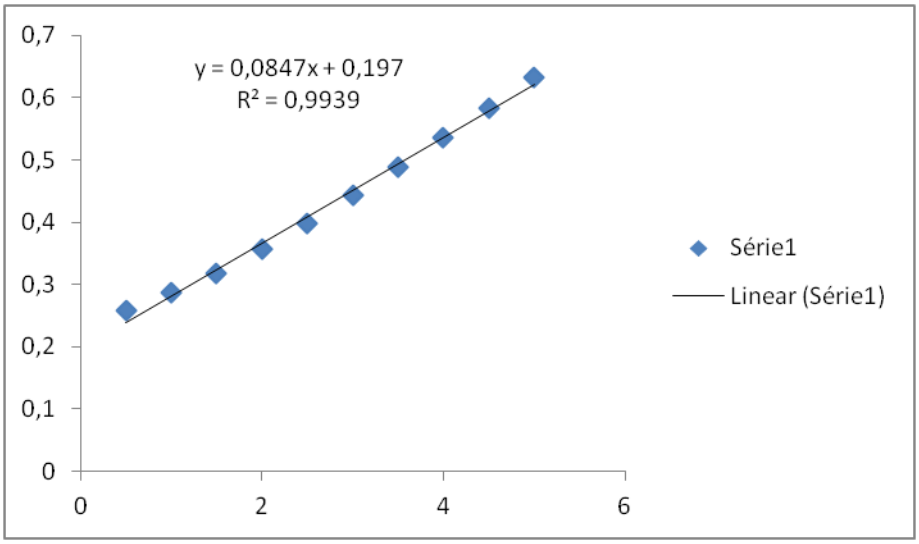
Duplicata I:

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,273	0,3012	0,3356	0,3765	0,422	0,4686	0,5155	0,5619	0,6084	0,6564



Duplicata II:

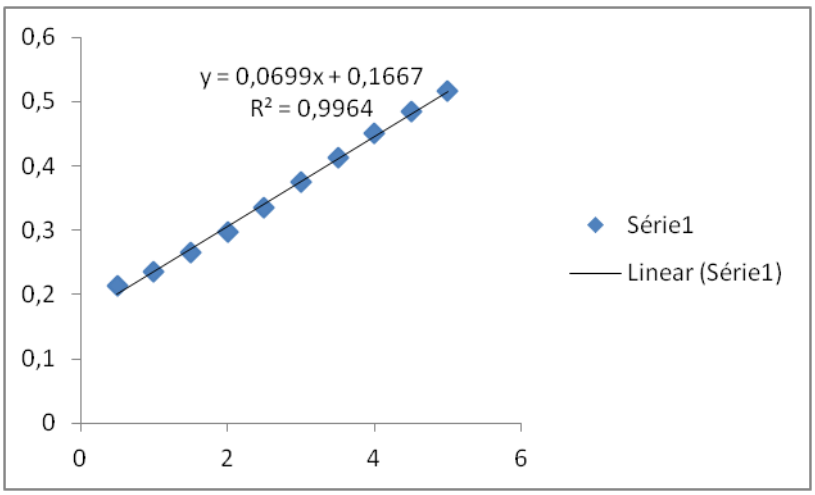
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,2581	0,286	0,3177	0,3558	0,3979	0,4427	0,4882	0,5359	0,5837	0,6325



4 Horas:

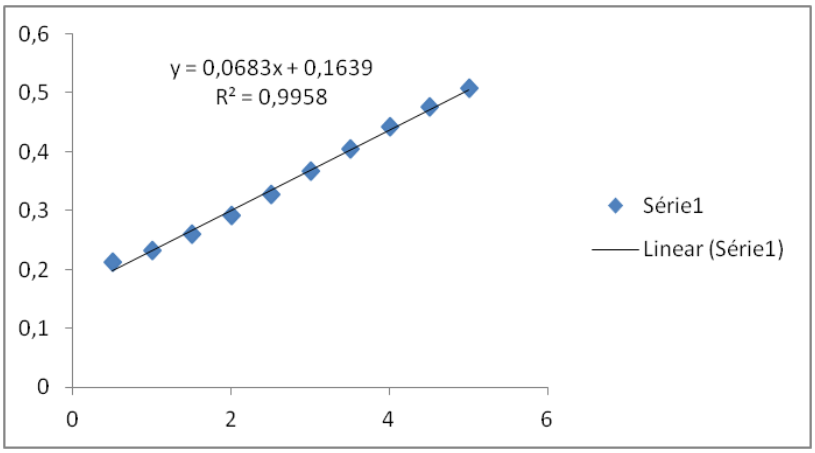
Duplicata I:

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,2148	0,2363	0,2649	0,2984	0,3352	0,3744	0,4131	0,4505	0,4849	0,5166



Duplicata II:

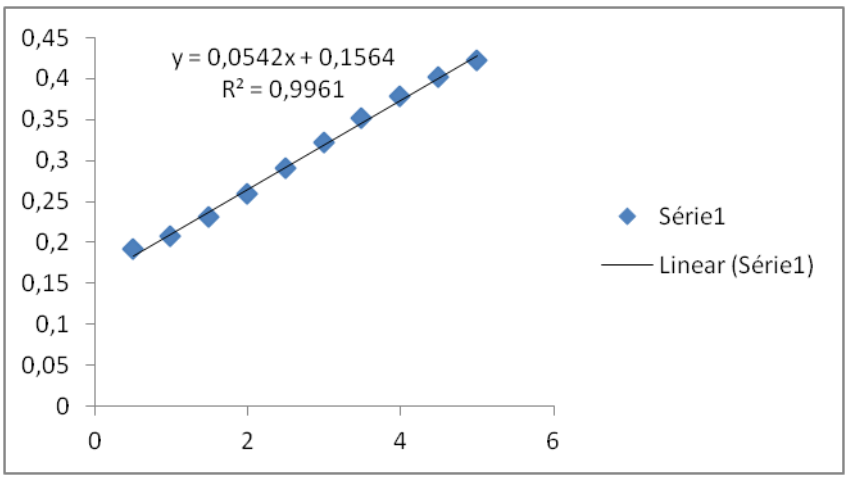
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,212	0,2325	0,26	0,2921	0,3275	0,3655	0,4037	0,4416	0,4757	0,5067



6 Horas:

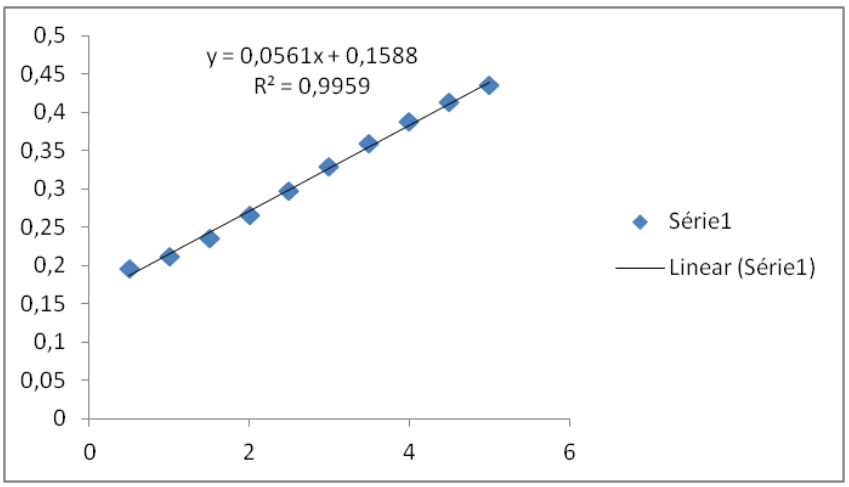
Duplicata I

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,1913	0,2074	0,2313	0,2593	0,2908	0,3219	0,3513	0,3781	0,4014	0,4217



Duplicata II:

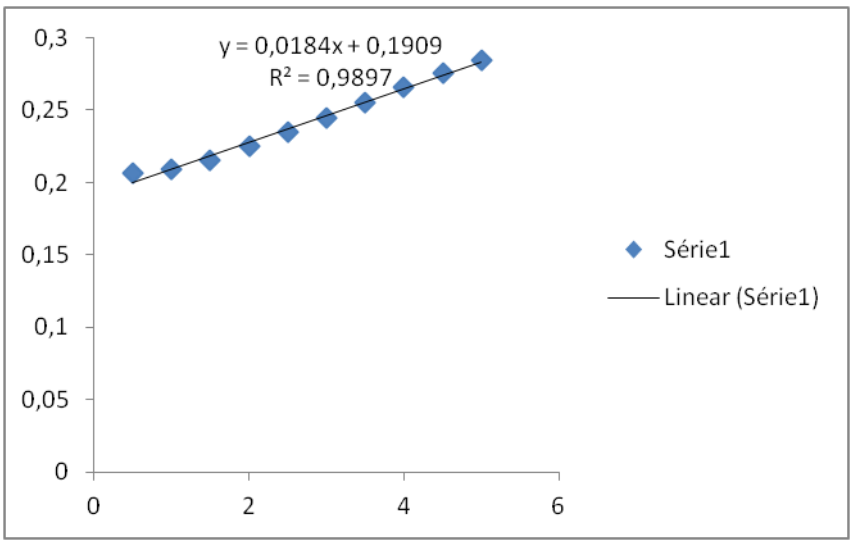
Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,1964	0,2121	0,2358	0,2648	0,2972	0,3291	0,3596	0,3879	0,4135	0,4344



24 Horas:

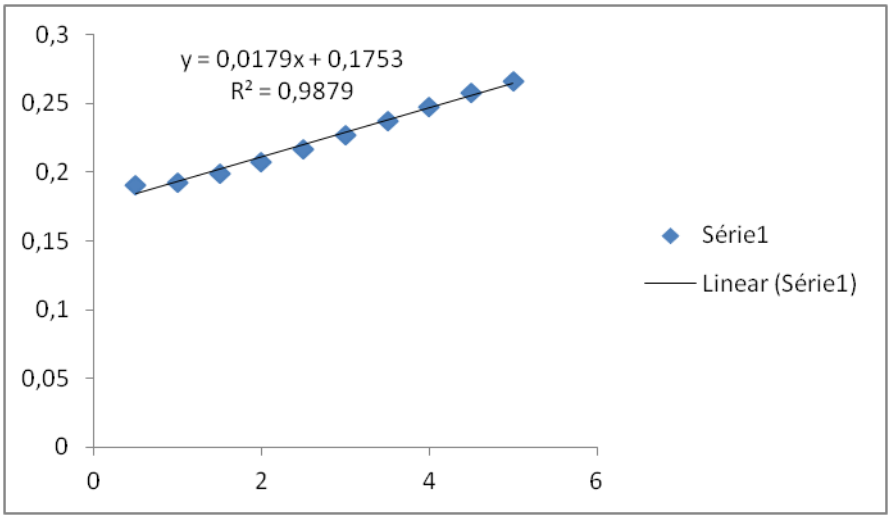
Duplicata I:

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,2065	0,2086	0,2154	0,2245	0,2348	0,2447	0,2549	0,2654	0,2752	0,2841



Duplicata II:

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,1909	0,1927	0,1993	0,2077	0,2173	0,2272	0,2379	0,2476	0,2577	0,2662



Cálculos:

Duplicata I:

Horas	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)
0	36000	0,4433	0,02	12,31389	615,6944
2	36000	0,0872	0,04	2,422222	60,55556
4	36000	0,0699	0,04	1,941667	48,54167
6	36000	0,0542	0,04	1,505556	37,63889
24	36000	0,0184	0,04	0,511111	12,77778

Duplicata II:

Horas	Coeficiente de extinção (ABTS 420nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)
0	36000	0,4657	0,02	12,93611	646,8056
2	36000	0,0847	0,04	2,352778	58,81944
4	36000	0,0683	0,04	1,897222	47,43056
6	36000	0,0561	0,04	1,558333	38,95833
24	36000	0,0179	0,04	0,497222	12,43056

Média e desvio padrão:

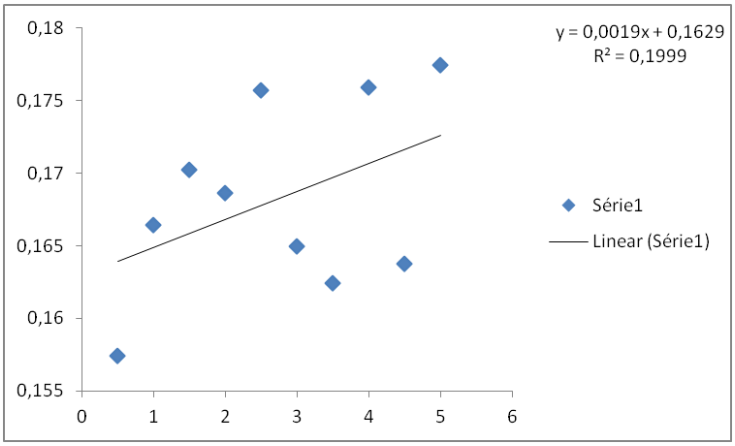
	Atividade enzimática (U/L)	Atividade enzimática (U/L)	Média	Desvio padrão
0	615,6944	646,8056	631,25	0,015839
2	60,55556	58,81944	59,6875	0,001768
4	48,54167	47,43056	47,98611	0,001131
6	37,63889	38,95833	38,29861	0,001344
24	12,77778	12,43056	12,60417	0,000354

Manganês peroxidase:

0 Horas:

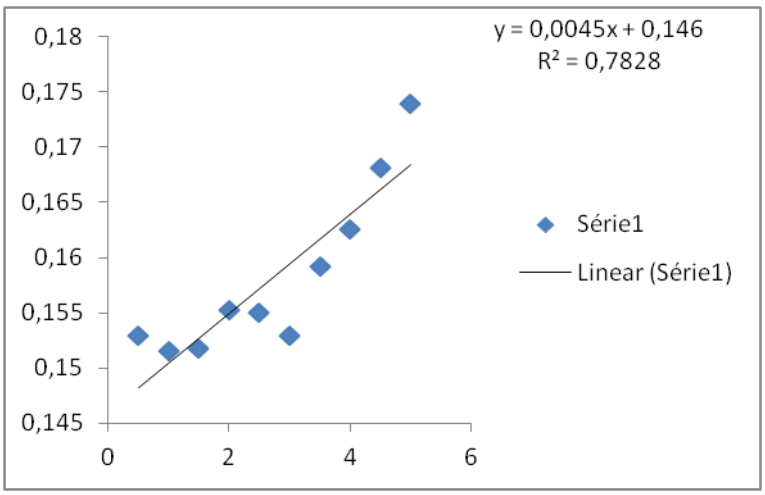
Duplicata I:

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,1574	0,1664	0,1702	0,1686	0,1757	0,1649	0,1624	0,1759	0,1637	0,1774



Duplicata II:

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,1529	0,1516	0,1518	0,1553	0,155	0,1529	0,1592	0,1626	0,1682	0,174



Cálculo manganês peroxidase:

Horas	Coeficiente de extinção (Guaiacol 465nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)
0	12000	0,0019	0,07	0,158333	2,261905
0	12000	0,0045	0,07	0,375	5,357143

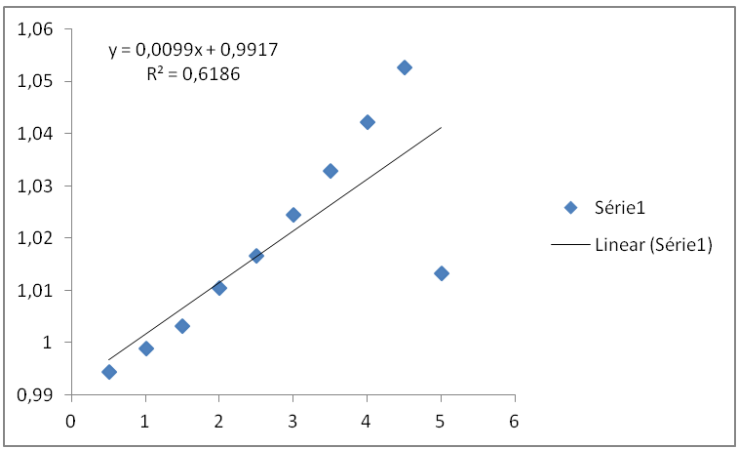
Média e desvio padrão:

Horas	Atividade enzimática (U/L)	Atividade enzimática (U/L)	Média	Desvipad
0	2,261905	5,357143	3,809524	0,001838

Lignina peroxidase:

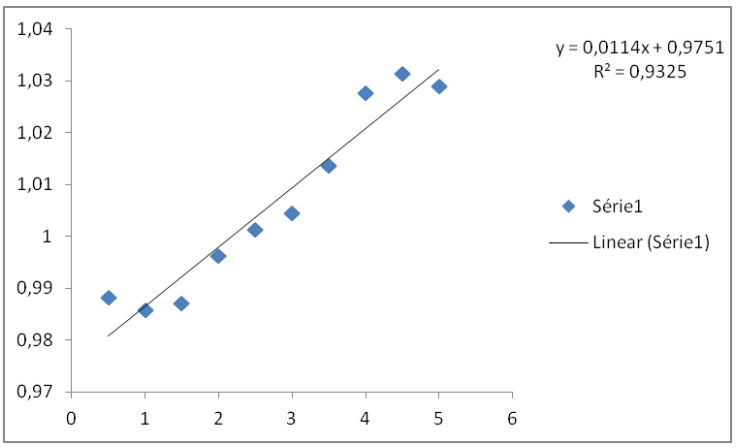
Duplicata I

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,9944	0,9989	1,0032	1,0105	1,0166	1,0246	1,0329	1,0422	1,0528	1,0133



Duplicata II:

Tempo:	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
	0,9882	0,985867	0,9872	0,996367	1,001367	1,004567	1,0137	1,027633	1,031467	1,028933



Cálculo Lignina peroxidase:

Horas	Coeficiente de extinção (Veratril álcool 310nm)	Inclinação do gráfico	Extrato enzimático (mL)	mMol min	Atividade enzimática (U/L)
0	9300	0,0099	0,07	1,064516	15,20737
0	9300	0,0114	0,07	1,225806	17,51152

Média e desvio padrão:

Horas	Atividade enzimática (U/L)	Atividade enzimática (U/L)	Média	Desvipad
0	15,20737	17,51152	16,35945	0,001061