UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CARLAILE FERNANDA DE OLIVEIRA NOGUEIRA

**Análise e caracterização do secretoma do fungo termofílico *Malbranchea pulchella*
linhagem 6278**

Lorena

2017

CARLAILE FERNANDA DE OLIVEIRA NOGUEIRA

**Análise e caracterização do secretoma do fungo termofílico *Malbranchea pulchella*
linhagem 6278**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Versão Original

Lorena

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nogueira, Carlaile Fernanda de Oliveira
Análise e caracterização do secretoma do fungo
termofílico *Malbranchea pulchella* linhagem 6278 /
Carlaile Fernanda de Oliveira Nogueira; orientador
Fernando Segato - Versão Original. - Lorena, 2017.
133 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Fernando Segato

1. Fungos termófilos. 2. Fungos celulolíticos. 3.
Enzimas. 4. Hidrólise. 5. Biomassa. I. Título. II.
Segato, Fernando, orient.

Dedico este trabalho a minha família por acreditar que a educação é sempre o melhor caminho. Aos meus pais e irmão, por estarem sempre ao meu lado apesar da distância e por entenderem a ausência ao longo desses 8 anos de estudo até a pós-graduação. Aos meus queridos avós, Jajo, Adélia e Odethe, por serem fonte de inspiração e perseverança. Em especial, ao meu exemplo de vida, meu avô José de Oliveira *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Fernando Segato, pelo privilégio de ter sido sua primeira orientada e por ter me aceitado como sua aluna, pelas oportunidades de crescimento, pela abertura para discussões e para novas ideias, pela atenção e paciência ao compartilhar seus conhecimentos, além da indiscutível amizade, compreensão e confiança. Muito obrigada.

Aos professores Dr. André Ferraz e Dra. Juliana Velasco (CNPEM), pelas valiosas orientações e direcionamentos desde o momento da banca, que ajudaram não somente no desenvolvimento desse projeto, mas também no meu crescimento profissional. Agradeço por terem acolhido o trabalho, pelas oportunidades de colaboração e de discussão.

A todos os professores do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP que tornaram a execução desse trabalho possível, em especial, aos professores Dr. André Ferraz, Dra. Adriane Milagres, Dra. Maria Bernadete Medeiros e Dr. Valdeir Arantes pela concessão de materiais e equipamentos, e por, gentilmente, compartilhar sua infraestrutura. Da mesma forma, agradeço a prestatividade dos alunos e funcionários de seus respectivos grupos de pesquisa. Em especial, agradeço aos funcionários José Moreira e José Carlos (Cobrinha) pela disposição, amizade e ajuda em geral.

Ao professor Dr. André Ferraz também pela concessão de equipamentos e suporte para a análise de microespectrometria-UV, em especial, ao José Moreira pelo paciente suporte durante o preparo das amostras para microscopia e caracterização química.

Ao professor Dr. Durval Rodrigues Jr. (DEMAR, EEL-USP), pela concessão de equipamentos para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em especial, ao Beto Ferreira pelo suporte com o preparo de amostra e operação do microscópio.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), CNPEM, pelo suporte com os equipamentos multiusuários de espectrometria de massas e de processamento de dados, em especial, à Bianca Pauletti e à Romênia Domingues pelo constante suporte ao usuário externo, pela atenção, disposição e profissionalismo durante toda a etapa de agendamento, preparo das amostras até a entrega dos dados.

À professora Dra. Juliana Velasco (CNPEM), pelo apoio com as análises do secretoma, pela concessão de *primers* para amplificação gênica e suporte para o sequenciamento gênico. Agradeço também a sua equipe técnica muito profissional e ao seu aluno, meu amigo, Antônio Kaupert Jr. (IB-UNICAMP), pela disposição e paciência em compartilhar conhecimentos e pela ajuda com os programas de bioinformática e apoio com as análises do secretoma.

Ao Programa de Biotecnologia Industrial da EEL-USP pela concessão de auxílio financeiro, PROAP, para realização de trabalho em campo no LNBio (CNPEM).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro com a concessão de bolsa de mestrado.

Aos amigos do departamento, em especial, Gabriela Berto, Germano Siqueira, Fernanda Valadares, Angela Machado e Thales Costa, que contribuíram com sugestões e ensinamentos desde o início no mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Sintética e Molecular – SYMBL, pela convivência saudável e amizade.

A minha família, pelo amor e apoio incondicionais, por acreditarem no meu potencial e em futuro profissional melhor com a realização do mestrado, pelo suporte integral durante o período de mestrado e pela viagem ao 38th SBFC, Baltimore. Ao meu irmão, pelo apoio com as referências e paciência em me ouvir sobre o projeto.

Aos meus bons amigos, Felipe Montoya e Maiara Paparele, por compartilhar seu dia-a-dia e todos os ótimos momentos, pelos ensinamentos e paciência mesmo nos momentos difíceis, e, em especial, ao Omar Uyarte, por ter acompanhado meu crescimento e compartilhado sua vida, pelos ensinamentos, companheirismo, apoio e incentivo constantes.

Aos meus amigos moranguetes, pelos momentos de apoio e descontração e por fazerem minha estadia em Lorena sempre mais alegre.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e agradeço a Deus por me iluminar em todos os momentos, principalmente, nos mais difíceis.

RESUMO

NOGUEIRA, C. F. O. **Análise e caracterização do secretoma do fungo termofílico *Malbranchea pulchella* linhagem 6278**. 2017. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2017.

A despolimerização enzimática de componentes de biomassa é um processo chave para indústrias de bioenergia. A busca por novas enzimas aumentou os estudos dos secretomas de microrganismos degradadores de biomassa. Os fungos filamentosos são importantes agentes na reciclagem de carbono na natureza, apresentando potenciais enzimas para a conversão de biomassa. *Malbranchea pulchella* é um ascomiceto termofílico bioprospectado na Floresta Atlântica (região de Minas Gerais-Brasil), cuja análise e caracterização do secretoma, juntamente com a capacidade de biodegradação, foram foco deste estudo. O cultivo semi-sólido deste fungo em substratos lignificado (madeira de eucalipto moída) e “não lignificado” (polpa Kraft branqueada) por 60 dias resultou em perdas de peso de cerca de 5% e 52%, respectivamente. Para o estudo da diversidade das enzimas produzidas por *M. pulchella*, o secretoma foi avaliado em culturas submersas de 3 dias, utilizando as fontes de carbono anteriormente mencionadas. Os resultados de LC-MS/MS mostraram que o fungo foi capaz de secretar uma série de enzimas lignocelulolíticas. As enzimas proeminentes foram as glicosil-hidrolases com um total de 29 e 37 CAZymes nos substratos lignificado e “não-lignificado”, respectivamente, sendo as famílias GH3 e GH18 encontradas em maior número. Considerando as enzimas oxidativas, um total de 12 e 13 CAZymes nos substratos lignificado e “não lignificado”, respectivamente, sendo as famílias AA7 e AA9 as mais predominantes. Também foram detectadas proteínas não-CAZymes apresentando domínios alergênicos, que estão relacionados com proteínas semelhantes a expansinas de plantas. O secretoma produzido com substrato de polpa branqueada foi utilizado em ensaio de hidrólise com polpa Kraft e também em contribuição com Celluclast 1,5 L para hidrólise de polpa de dissolução e de Avicel. Os resultados indicaram que *M. pulchella* produz uma maquinaria enzimática interessante, que pode degradar celulose amorfa e cristalina, sendo potencial aplicação em hidrólise da biomassa lignocelulósica.

Palavras chave: Fungos termofílicos, Fungos celulolíticos, Enzimas, Hidrólise, Biomassa

ABSTRACT

NOGUEIRA, C. F. O. **Secretome analysis and characterization of thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* strain 6278**. 2017. 133p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2017.

Enzymatic depolymerization of biomass components is a key process for bioenergy industries. The search for new enzymes for this task has increased secretome studies in biomass-degrading microorganisms. Filamentous fungi are important players in carbon recycling in nature, presenting potential enzymes for biomass conversion. *Malbranchea pulchella* is a thermophilic ascomycete bio prospected in Brazilian Atlantic forest whose secretome analysis and characterization together with biodegradation ability were focus of this study. Semi-solid cultivation of this fungus on lignified (milled eucalyptus wood) and non-lignified (bleached eucalyptus pulp) substrates for 60 days resulted in almost 5% and 52% weight losses, respectively. To understand the diversity of enzymes produced by *M. pulchella* the secretome was evaluated in 3-day submerge cultures using the previously mentioned carbon sources. LC-MS/MS results showed the fungus was able to secrete an array of lignocellulolytic enzymes. The prominent enzymes were glycosyl hydrolases with a total of 29 and 37 CAZymes in lignified and non-lignified substrates, respectively, with GH3 and GH18 families found in greatest number. Considering the oxidative enzymes, a total of 12 and 13 CAZymes were found in lignified and non-lignified substrates, respectively, being AA7 and AA9 families most expressive. Non-CAZymes proteins showing allergen domains, which are related with expansin-like proteins from plants, were also detected. The secretome produced with bleached eucalyptus pulp substrate was assayed for hydrolysis of Kraft pulp and in contribution with Celluclast 1.5 L for dissolving pulp and Avicel hydrolysis as well. Results indicated that *M. pulchella* produce an interesting enzymatic array that can disrupt both amorphous and crystalline cellulose, demonstred as potencial secretome for biomass hydrolysis.

Keywords: Thermophilic fungi, Cellulolitic fungi, Enzymes, Hydrolysis, Biomass

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo representativo de desconstrução da celulose, mostrando as principais enzimas hidrolíticas do modelo tradicional, juntamente com as enzimas oxidativas.	24
Figura 2 - Exemplos de enzimas necessárias para a despolimerização de diferentes tipos de hemiceluloses.	26
Figura 3 - Esquema representativo do controle celular e expressão gênica de acordo com sinal recebido do ambiente.	31
Figura 4 - Taxa média de crescimento dos fungos <i>A. fumigatus</i> , <i>M. pulchella</i> e <i>T. reesei</i> em meio PDA incubados nas temperaturas de 27 °C, 37 °C, 45 °C e 55 °C para avaliação do efeito da temperatura.	57
Figura 5 - Avaliação das características visuais das colônias do fungo <i>M. pulchella</i> quando submetidas a diferentes temperaturas.	57
Figura 6 - Acompanhamento do crescimento de <i>M. pulchella</i> através da medição do diâmetro das colônias com pH na faixa de 6,0 a 7,5 em meio MB-ágar acrescido de glicose incubados nas temperaturas de 37 °C e 45 °C durante 7 dias de cultivo.	59
Figura 7 - Avaliação das características visuais das colônias do fungo <i>M. pulchella</i> quando cultivado em meio MB-ágar acrescido de glicose com variação de pH na faixa de 6,0 a 7,5 incubados nas temperaturas de 37°C e 45°C durante 7 dias de cultivo.	60
Figura 8 - Validação do crescimento de <i>M. pulchella</i> incubado por 5 dias à 45 °C em diferentes fontes de carbono.	62
Figura 9 - Evolução percentual da perda de massa e perda em massa no teor de componentes dos substratos polpa Kraft (A) e eucalipto moído e lavado (B).	68
Figura 10 - Espectro de absorção UV da lignina do eucalipto <i>in natura</i> e biodegradado no período de 7, 14 e 21 dias (A) Microscopia das paredes celulares presentes na lâmina avaliadas de 21 dias de biodegradação (B).	70
Figura 11 - Imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
Figura 12 - Comparação entre perda de massa de glucana e xilana e níveis de atividade das enzimas celobiohidrolase, endoglucanase, mananase e xilanase observados durante a biodegradação de polpa Kraft (A) e eucalipto moído e lavado (B) por <i>M. pulchella</i>	73
Figura 13 - Perda de massa dos substratos, polpa Kraft (A) e eucalipto moído e lavado (B), comparada com dosagem de proteínas totais extraídas dos cultivos semi-sólidos durante a biodegradação por <i>M. pulchella</i> entre 7 e 21 dias.	74

Figura 14 - Eletroforese SDS-PAGE (10%), mostrando perfil proteico obtido a partir de 10 µg do extrato concentrado, obtido após cultivo de <i>M. pulchella</i> em meio semi-sólido por 7 dias.	76
Figura 15 - Detecção de açúcares redutores presentes no meio de cultivo (A) e dosagem de proteínas totais produzidas (B) em meio submerso com 0,5% (m/v) de sólidos ao longo de 72h de cultivo com <i>M. pulchella</i>	77
Figura 16 - Eletroforese SDS-PAGE, mostrando perfil proteico obtido a partir de 15 µg do extrato proteico concentrado 100X, provindo do cultivo de <i>M. pulchella</i> em meio submerso com 0,5% (m/v) de sólidos por 72 h (A) Detecção de bandas pelo software Image Lab (B)	79
Figura 17 - Distribuição das proteínas identificadas no secretoma global em relação a predição de localização pelo <i>software</i> Protcom com a anotação <i>GO annotation</i> (A) Distribuição em diagrama de Venn baseada na presença de peptídeo sinal, predição de secreção não clássica e proteína transmembrana (B).....	82
Figura 18 - Distribuição de proteínas obtidas no secretoma global (A) e nas condições de indução em polpa Kraft (B), eucalipto (C) e glicose (D), segundo a classificação de função baseada em seu domínio conservado.	83
Figura 19 - Distribuição das proteínas identificadas nos diferentes substratos (A), distribuição das CAZymes (B), distribuição de famílias CAZy (C) e distribuição das CAZymes por número de proteínas identificadas, segundo condição de indução pelo substrato (D).	84
Figura 20 - Conversão percentual de glucana e xilana resultantes do ensaio de hidrólise com alta carga de proteínas e Polpa Kraft em 2% (p/v) de sólidos por 48 h.	90
Figura 21 - Conversão percentual de glucana resultantes dos ensaios de hidrólise com baixa carga de proteínas de <i>M. pulchella</i> e suplementação com coquetel Celluclast 1.5 L com polpa de dissolução (A) e com Avicel (B) em reação contendo 2% (m/v) de sólidos por 48 h. ..	92
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), mostrando o produto da amplificação com os <i>primers</i> ITS5/ITS4 realizado em duplicata, com teste de temperatura de anelamento 56, 58 e 60 °C, a partir do DNAg extraído.....	95
Figura 23 – Alinhamento global das sequências ITS das linhagens selecionadas pela busca Blastn (A) Árvore de inferência filogenética (B).	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Apresentação das classes de famílias CAZy descritas, sigla e principal função e o número de famílias depositadas no banco de dados.....	23
Tabela 2 - Parâmetros utilizados nos ciclos e reações de PCR para amplificação da sequência ITS de <i>M. pulchella</i>	51
Tabela 3 - Composição química, Rendimento de Sólidos Insolúveis (RSI) e balanço de massa dos componentes da Polpa Kraft não tratada e biodegradada por <i>M. pulchella</i> durante o período entre 7 e 60 dias.....	65
Tabela 4 - Composição química, Rendimento de Sólidos Insolúveis (RSI) e balanço de massa dos componentes do Eucalipto moído e biodegradado por <i>M. pulchella</i> durante o período entre 7 e 60 dias.....	65
Tabela 5 - Painel de substrato contendo níveis de atividade enzimática testados sobre diferentes substratos modelos para os secretomas obtidos de polpa Kraft, eucalipto e glicose.	88
Tabela 6 - Concentração do DNA e grau de pureza obtido do produto de amplificação purificado, segundo produto de amplificação resultante da reação de PCR diferentes temperaturas de anelamento.....	96
Tabela 7 - Fungos utilizados para estudo de semelhança e homologia segundo alinhamento significativo com a sequência intergênica ITS de <i>M. pulchella</i>	98

LISTA DE ABREVIATURAS

1G – primeira geração

2G – segunda geração

CAZy – Carbohydrate-Active enZYme

CAZyme – enzimas ativas em carboidratos

GH – Glicosil Hidrolases

GT – Glicosil Transferases

PL – Polissacarídeo Liases

CE – Carboidrato Esterases

AA – Proteína com atividade auxiliar

CBM – Módulo de ligação a carboidratos

LPMOs – *Lytic Polysaccharide MonoOxygenase*

CMC – Carboximetilcelulose

CDH – Celobiose desidrogenase

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ITS – Região de transcrição interna não codificadora do DNA ribossomal

FPU – Atividade em papel de filtro

PMF – *Peptide mass fingerprint* (massa de peptídeo rastreável)

TCA – Ácido tricloroacético

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas

SDS-PAGE – Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

MB – Meio Básico

PDA - Batata-dextrose-ágar

RSI – Rendimento Sólido Insolúvel

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

PES - Poliétersulfona

FDR - Taxa de falso positivo

Blastp – Alinhamento de proteínas

Blastn – Alinhamento de nucleotídeos

MM – Marcador molecular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	BIORREFINARIAS E BIOCOMBUSTÍVEIS	17
2.2	COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	18
2.3	ASCOMICETOS E A DESCONSTRUÇÃO DA PAREDE CELULAR	21
2.3.1	MODELOS DE DESPOLIMERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	21
2.4	<i>MALBRANCHEA PULCHELLA</i>	26
2.5	ANÁLISE DO SECRETOMA	30
3	OBJETIVOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	MICRORGANISMOS	35
4.2	MEIOS DE CULTIVO	35
4.3	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	36
4.4	MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E PREPARO PARA UTILIZAÇÃO NO CULTIVO	37
4.5	AVALIAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO	38
4.5.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS	38
4.5.2	ANÁLISES DE MICROSCOPIA DOS MATERIAIS RESULTANTES DA BIODEGRADAÇÃO	39
4.5.3	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS EM CULTIVO SEMI-SÓLIDO, EXTRAÇÃO DE ENZIMAS E ELETROFORESE SDS-PAGE	41
4.6	DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS	42
4.7	ANÁLISE DO SECRETOMA DE <i>M. PULCHELLA</i> EM CONDIÇÃO DE INDUÇÃO PELO SUBSTRATO	42
4.7.1	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS EM MEIO SUBMERSO	42
4.7.2	RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS SECRETOMAS EM CONDIÇÃO DE INDUÇÃO PELO SUBSTRATO	44
4.7.3	PREPARO DE AMOSTRA PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	44
4.7.4	ANÁLISE DE DADOS DOS SECRETOMAS	46
4.8	CARACTERIZAÇÃO DOS SECRETOMAS PRODUZIDOS EM CONDIÇÃO DE INDUÇÃO PELO SUBSTRATO	47
4.9	ENSAIOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	48
4.10	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA INTERGÊNICA (ITS)	50
4.10.1	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	50
4.10.2	AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA SEQUÊNCIA INTERGÊNICA (ITS)	51
4.10.3	ANÁLISES COMPARATIVAS DA SEQUÊNCIA ITS DE <i>M. PULCHELLA</i> COM LINHAGENS DE <i>M. CINNAMOMEA</i> E ANÁLISE FILOGENÉTICA	52

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	ANÁLISE DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	53
5.1.1	EFEITO DA TEMPERATURA	54
5.1.2	EFEITO DO pH	58
5.1.3	EFEITO DA FONTE DE CARBONO	60
5.2	BIODEGRADAÇÃO	63
5.2.1	AVALIAÇÃO DE IMAGEM DOS MATERIAIS BIODEGRADADOS	69
5.2.2	PERDA DE MASSA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS	72
5.3	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DE <i>M. PULCHELLA</i>	75
5.3.1	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS E PREPARO DE AMOSTRA	75
5.3.2	ANÁLISE DO SECRETOMA DE <i>M. PULCHELLA</i>	79
5.3.3	CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DE <i>M. PULCHELLA</i>	87
5.4	ANÁLISE DA REGIÃO INTERGÊNICA ITS DE <i>M. PULCHELLA</i>	94
6	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	103
	<u>ANEXO A – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE SAIS, ELEMENTOS TRAÇOS E VITAMINAS UTILIZADAS NOS CULTIVOS</u>	112
	<u>APÊNDICE A – DETALHAMENTO DOS CARBOIDRATOS EM TERMOS DE ORIGEM, COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES, LIGAÇÃO GLICOSÍDICA DA CADEIA PRINCIPAL E FABRICANTE.</u>	113
	<u>APÊNDICE C – SECRETOMA</u>	116
	<u>APÊNDICE D – CINÉTICA ENZIMÁTICA</u>	130
	<u>APÊNDICE E – RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA SEQUÊNCIA INTERGÊNICA (ITS)</u>	131
	<u>APÊNDICE F – PUBLICAÇÃO</u>	133

1 INTRODUÇÃO

Importantes avanços em relação à viabilização econômica da produção de etanol de segunda geração (2G) foram observados ao longo dos últimos anos (ERICKSON; NELSON; WINTERS, 2012). As etapas de pré-tratamento, produção de enzimas e hidrólise enzimática são aquelas que agregam maior custo ao processo de conversão da biomassa lignocelulósica para a produção dos biocombustíveis 2G, produzidos a partir da fração não fermentescível da biomassa¹. Dentre as etapas citadas, a hidrólise enzimática é o principal entrave para o desenvolvimento do etanol 2G a preços competitivos em relação aos combustíveis fósseis líquidos, como a gasolina e o diesel. Dessa forma, a hidrólise constitui-se como processo chave para o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes e rentáveis para produção de biocombustíveis (HIMMEL et al., 2007; WYMAN, 2007).

Os principais desafios relacionados à hidrólise enzimática são a acessibilidade aos polissacarídeos, que dependem dos pré-tratamentos empregados, e a despolimerização dos materiais lignocelulósicos², a qual está ligada às características dos coquetéis enzimáticos (HIMMEL et al., 2007; STEPHANOPOULOS, 2007). Com isso, grandes empresas produtoras de enzimas encontram oportunidades para o aprimoramento dos coquetéis comerciais através do engenheiramento genético e *screening* de novas enzimas mais ativas, robustas e mais compatíveis aos processos industriais existentes (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). O *screening* também pode ser realizado através de espécies prospectadas. Projetos de prospecção de fungos, tanto no Brasil como internacionalmente, apontam para o crescente interesse em conhecer a maquinaria genética e metabólica envolvida na produção de enzimas, oriundas de fungos filamentosos, assim como o potencial de utilização para a degradação da biomassa, entre outras aplicações industriais (BAKER et al., 2009; GRIGORIEV et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2006; RIBEIRO et al., 2014a).

Os fungos são utilizados para a produção de metabólitos, ácidos orgânicos, biocombustíveis e enzimas de interesse industrial. Grandes fabricantes de enzimas como a Novozymes, DSM e DuPont utilizam um pequeno número de ascomicetos super secretores de enzimas hidrolíticas para produção de coquetéis enzimáticos. Os principais ascomicetos utilizados industrialmente com esta finalidade são os fungos mesofílicos dos gêneros

¹Biomassa: toda matéria orgânica renovável, em sua maioria, de origem vegetal ou animal, consideradas ou não como subprodutos dentro da cadeia produtiva.

²Material lignocelulósico: origem vegetal, composto majoritariamente por lignina, celulose e hemicelulose (DAVISON et al., 2013).

Trichoderma e *Aspergillus* (MÄKELÄ; DONOFRIO; DE VRIES, 2014; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Entretanto, uma grande expectativa em relação a prospecção por novas enzimas está no estudo dos ascomicetos termofílicos. Além de secretar grandes quantidades de proteínas, esses microrganismos possuem a vantagem adicional de produzir enzimas termoestáveis, com o uso das quais é possível aumentar a eficiência da hidrólise da biomassa pelo emprego de temperaturas mais elevadas (BERKA et al., 2011; BLUMER-SCHUETTE et al., 2014).

No caso do fungo *Malbranchea pulchella*, um ascomiceto termofílico isolado do solo e de plantas em processo de degradação, dois trabalhos publicados recentemente indicam seu potencial como produtor de enzimas relacionadas a degradação de material lignocelulósico. Um aspecto que merece destaque é a produção de uma xilanase da família 10 das glicosil hidrolases (GH), com atividade ótima a 80 °C, a qual foi reportada pelo uso na hidrólise de bagaço-de-cana explodido gerar maior conversão de xilana do que o obtido com o coquetel comercial IOC-4145 de xilanases produzido por *Thermomyces lanuginosus* (Novozyme) (RIBEIRO et al., 2014a, 2014b). Dessa forma, a análise do secretoma desse ascomiceto, que ainda é pouco explorado na literatura, assim como a caracterização das CAZymes³ produzidas são vistas como oportunidades para a descoberta de novas enzimas para aplicação em hidrólise de materiais lignocelulósicos e tem-se a expectativa de identificar potenciais versões mais ativas ou que incrementem a atividade das enzimas conhecidas atualmente.

No presente trabalho, reportamos o secretoma produzido por *M. pulchella* em condição de indução em presença de biomassa “não-lignificada” e lignificada, avaliamos o perfil enzimático e caracterizamos o potencial hidrolítico e oxidativo das CAZymes produzidas. Em complementação, estudamos o efeito de parâmetros de cultivo como a temperatura, o pH e diferentes fontes de carbono no crescimento do fungo e avaliamos a capacidade de biodegradação frente as respectivas biomassas. Por fim, comparamos a semelhança e a homologia de *M. pulchella* com outro ascomiceto termofílico, *Malbranchea cinnamoema*, o qual é amplamente estudado do ponto de vista genômico e bioquímico.

³ CAZymes: enzimas ativas em carboidratos, do inglês *Carbohydrate Active-enZymes*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIORREFINARIAS E BIOCOMBUSTÍVEIS

Diversos fatores impulsionam a mudança da matriz energética mundial para a busca por combustíveis obtidos de fontes renováveis, alguns deles são: o aumento nas emissões dos gases que causam o efeito estufa, a instabilidade econômica dos países do Oeste Asiático, que ocasionam as variações no preço e no fornecimento do petróleo, juntamente com a dependência de combustíveis fósseis nos setores da indústria e do transporte. Neste contexto, o desenvolvimento de um novo conceito de indústria e de processo de produção, voltados para uma vertente mais sustentável são necessárias para atender a demanda por bioenergia e bioprodutos para os próximos anos. Esse conceito de indústria é denominado biorrefinaria (KING, 2010; MENON; RAO, 2012; STEPHANOPOULOS, 2007).

Dois dos principais objetivos da biorrefinaria incluem a utilização preferencial de biomassa como matéria-prima, devido à ampla diversidade de fontes disponíveis, e seu uso racional através de tecnologias de fracionamento com o fim de aproveitá-la de forma integral. Os principais setores que geram grandes quantidades de biomassa como excedentes da cadeia produtiva são o agrícola e o florestal. Existem muitas biorrefinarias com tecnologias desenvolvidas e consolidadas no aproveitamento de materiais lignocelulósicos, dentre as quais é possível citar as usinas de açúcar e álcool e as indústrias de papel e celulose. Entretanto, existe, ainda, um grande potencial para o aumento e diversificação da produção utilizando a biomassa excedente gerada nesses setores industriais (FITZPATRICK et al., 2010; GHATAK, 2011; KAMM; GRUBER; KAMM, 2005; KING, 2010; MENON; RAO, 2012; OCTAVE; THOMAS, 2009)

A biomassa, que vem apresentando um maior potencial para uso em biorrefinarias no Brasil é o bagaço-de-cana, pela alta produtividade alcançada nas lavouras que é devida ao alto volume de etanol de primeira geração⁴ (1G) produzido pelas usinas sucro-alcooleiras (volume de etanol total 30,2 milhões de litros, safra de cana de 666,8 mil toneladas e produção de bagaço aproximadamente 167 mil toneladas (1/3 da safra de cana), na safra de 2015/2016⁵). O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol 1G. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor em volume depois dos Estados Unidos com

⁴ Etanol produzido a partir da fermentação de fermentescíveis, como a sacarose (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2014).

⁵ <http://www.unicadata.com.br/> (UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2017).

o etanol 1G baseado em milho, segundo análise da *World Fuel Ethanol Production – Renewable Fuels Association* (RFA)⁶. Com relação ao setor florestal no Brasil, a indústria de processamento da madeira e da colheita florestal geram anualmente cerca de 41 milhões de toneladas de resíduos vegetais, como lenha, cavacos, serragem e cascas. O bagaço-de-cana, os resíduos florestais e o licor negro são as principais biomassas utilizadas na geração de energia elétrica no Brasil, sendo que a base florestal representa 15,8% do total de biomassa utilizado para este fim, segundo Associação Brasileira dos Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF)⁷.

É possível perceber que, tanto nos setores de açúcar e álcool como no de papel e celulose, o aproveitamento da biomassa residual pós processamento concorre com a cogeração de energia. Embora a celulose e a hemicelulose presentes nos materiais lignocelulósicos possam ser utilizadas para gerar produtos de maior valor agregado, a biomassa é queimada para a produção de energia e calor para o consumo interno da linha produtiva ou venda de eletricidade (BUCKERIDGE et al., 2012; FITZPATRICK et al., 2010; JONKER et al., 2015). Por isso, vencer as barreiras tecnológicas para um efetivo fracionamento dos materiais lignocelulósicos e tornar os processos de utilização dessas frações rentáveis são objetivos comuns para o desenvolvimento do etanol 2G e de outros bioprodutos, suprimindo, desta maneira, a crescente demanda de mercado por bioenergia e bioprodutos no Brasil e no mundo (JONKER et al., 2015; KAMM; KAMM, 2004; KING, 2010; WYMAN, 2007).

2.2 COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos representam a fonte mais abundante e disponível de carbono no mundo a preços relativamente mais baratos se comparada com as fontes fósseis (LYND et al., 2008; WYMAN, 2007). Por serem variados, a composição destes materiais é dependente da espécie de planta, do tecido, época do ano, localização geográfica, idade, entre outros fatores (ALWANI et al., 2014). As principais frações que compõe a parede celular das plantas são: celulose, hemicelulose, lignina e outros compostos em menores proporções. Os teores dessas frações, em termos percentuais, somam as seguintes quantidades nas paredes celulares: cerca de 40% de celulose, 20-30% de hemicelulose, os

⁶ <http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/> (RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2017).

⁷ <http://www.ipef.br/estatisticas/> (ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS, 2013).

quais somam aproximadamente 70% do material seco, a lignina, pode variar entre 15-30%, entre outros componentes em menores proporções como proteínas, lipídeos, pectina, açúcares solúveis e minerais. A distribuição dos componentes principais pode variar consideravelmente ao longo das paredes vegetais, sendo a parede secundária é aquela que apresenta maior composição de celulose, envolvida em uma matriz com hemicelose e lignina (DAVISON et al., 2013; MARTÍNEZ et al., 2005).

O principal polissacarídeo dos materiais lignocelulósicos é a celulose, um polímero de anidroglicose de cadeia linear unido por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. As cadeias lineares de celulose unidas em feixes formam as microfibrilas, podendo apresentar-se em cadeias longas ou curtas de acordo com o grau de polimerização. Ao agregado microfibrilar é dado o nome de macrofibrila ou fibrila e, dependendo do ângulo que este empacotamento forma, é conferida a característica de cristalinidade (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). As ligações covalentes, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e eletroestáticas são as interações inter e intramolecular existentes nas cadeias de celulose, as quais proporcionam a estabilidade do empacotamento fibrilar. As moléculas estão ligadas tão fortemente no complexo de celulose que, mesmo enzimas ou moléculas de baixo peso molecular, apresentam difícil penetração (KIRK; CULLEN, 1998). Entretanto, há ainda regiões entre as cadeias de celulose que não estão unidas tão fortemente e são conhecidas como regiões amorfas ou semi-cristalinas. Esta característica, permite que estas regiões sejam hidrolisadas com maior facilidade em comparação as regiões cristalinas (ARANTES; SADDLER, 2010; MENON; RAO, 2012).

O segundo maior grupo de polissacarídeos presente nos materiais lignocelulósicos são as hemiceluloses, as quais são encontradas formando ligações com a celulose e a lignina. As hemiceluloses apresentam função de facilitar a incrustação das microfibrilas, mantendo a ordem da matriz lignocelulósica, podendo ser responsáveis pela porosidade da parede celular (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). Esse polissacarídeo se encontra distribuído tanto na parede vegetal primária, quanto na secundária, sendo que sua ocorrência pode estar mais concentrada em uma dessas paredes de acordo com o tipo de hemicelulose e da biomassa. A hemicelulose é um polímero heterogêneo formado por ligações β -1,4 em sua cadeia principal, formada por monômeros de xilose, manose ou glicose (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Encontram-se ligados a esta cadeia principal, grupos pendentes variados, tais como, acetil, hexoses (manose, glicose e galactose), pentoses (xilose e arabinose), ácidos urônicos (ácido glucurônico, galacturônico e metil galacturônico) e as

deoxihexoses (raminose e fucose) em menores proporções (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). Devido a sua composição heterogênea, que confere característica amorfa a sua estrutura, a hemicelulose possui menor estabilidade térmica e química se comparado à celulose, o que faz com que esse polímero seja hidrolisado mais facilmente (HIMMEL et al., 2007). A presença de ramificações na hemicelulose conduzem a um impedimento estérico para as enzimas, o que sugere a necessidade de um coquetel complexo para sua hidrólise total (GLASS et al., 2013; HORN et al., 2012).

A lignina é um dos três componentes em maior proporção na parede celular vegetal. Ela também está presente na parede secundária, fazendo ligações lignina-carboidratos. Entretanto, é encontrada em maiores concentrações na fração mais externa da parede celular, unindo as células vegetais adjacentes, região conhecida como laméla média (GUERRIERO; SERGEANT; HAUSMAN, 2014; MENON; RAO, 2012). Essa macromolécula é constituída por precursores chamados álcoois hidroxicinâmicos: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A composição da lignina pode variar segundo suas unidades de formação (guaiacil – G, siringil – S e *p*-hidroxifenil – H) de acordo com o tipo de planta. A presença da lignina confere propriedades mecânicas e biológicas aos materiais lignocelulósicos, como rigidez, hidrofobicidade e proteção contra degradação (MARTÍNEZ et al., 2005). Dessa forma, entende-se que quanto menos espessa for a parede celular, mais facilmente o material será degradado na natureza. Ou seja, quanto menos lignificadas forem a lamela média e outras camadas da parede celular, menor a resistência à degradação e maior a acessibilidade aos polissacarídeos. Isso é verificado com as polpas resultantes do processo de polpação química, como exemplo a polpa *Kraft* branqueada, em que a maior parte da lignina é removida, incluindo a lignina da laméla média (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Devido à associação, à distribuição e à organização entre os componentes da parede celular, é possível entender a forte interação e estabilidade da matriz lignocelulósica. À esta característica da parede celular vegetal é dado o nome de recalcitrância, sendo este arranjo responsável pela dificuldade de acessar os polissacarídeos estruturais da biomassa vegetal, além de se constituir como fator limitante para o desenvolvimento de processos em biorrefinarias (HIMMEL et al., 2007; OCTAVE; THOMAS, 2009; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

2.3 ASCOMICETOS E A DESCONSTRUÇÃO DA PAREDE CELULAR

Os fungos saprófitos são os organismos mais proeminentes como degradadores de materiais lignocelulósicos por possuírem capacidade natural de colonizar uma variedade de ambientes, como o solo e materiais em processo de biodegradação, crescer em diferentes tipos de substratos e produzir grandes quantidades de enzimas (GUERRIERO et al., 2015; PAYNE et al., 2015; ZHAO et al., 2014). Os fungos com capacidade de degradar material ligocelulósico podem ser classificados em três grupos, segundo as características macroscópicas de degradação: fungos de degradação branda (*soft rot*), degradação parda (*brown rot*) e degradação branca (*white rot*) (FERRAZ, 2004).

Por definição, os ascomicetos de degradação branda são os primeiros colonizadores da madeira em contato com o chão. Eles atacam células de reserva ou de transporte de açúcares e sais e são característicos por formar microcavidades na parede secundária, reduzindo a força da fibra de celulose. A despolimerização de lignina não é característica usual da maioria dos ascomicetos. A maioria possui pouca ou nenhuma capacidade para despolimerizar lignina. Aqueles que são capazes de degradar madeira apresentam degradação de material com pouca lignina. A degradação de lignina juntamente com os polissacarídeos ocorre após longo período de exposição (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009; ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990).

Contudo, as características macroscópicas de degradação dos materiais lignocelulósicos estão mais relacionadas à produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas e à eficiência de despolimerização do que restritamente a taxonomia. Assim, o perfil de enzimas necessárias para que o fungo colonize e degrade um material evidencia seu mecanismo de nutrição e estratégia de colonização (FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; RILEY et al., 2014).

2.3.1 MODELOS DE DESPOLIMERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os ascomicetos constituem um grupo bastante variado em relação à capacidade de produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas (PAYNE et al., 2015). Como exemplo, vê-se o gênero *Aspergillus* que possui alta capacidade de produzir enzimas xilanolíticas e pectinolíticas, já o *Trichoderma reesei* tem uma capacidade celulolítica mais proeminente e

Myceliophthora thermophila possui estratégia de degradação através de um sistema hidrolítico e oxidativo (SEGATO et al., 2014).

O modelo tradicional de degradação da celulose tinha como proposta a utilização de três tipos de hidrolases: endoglucanases (endo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.4), exo-glucanases (exo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.176 e EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), atuando colaborativamente na hidrólise da celulose e reduzindo a inibição pelo produto de reação. Inicialmente, esse modelo era baseado na classificação pelo *Enzyme Commission Number* (EC), o qual foi estabelecido em 1956 pela *International Union of Biochemistry* (IUB) e agrupava as enzimas de acordo com sua ação no substrato.

Há alguns anos, foi proposta uma nova classificação, a qual procurou relacionar não só a ação das enzimas sobre o substrato, como também a sequência de aminoácidos do domínio catalítico e a estrutura tridimensional das proteínas. A partir disto, foi criado um dos bancos de dados mais importantes na área de enzimas em conversão de biomassa: o *Carbohydrate Active enZymes* (CAZy)⁸ (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; DAVIES, 1997). O CAZy contém uma compilação de enzimas ativas em carboidratos, denominadas *CAZymes*, capazes de degradar, modificar ou criar ligações glicosídicas (LEVASSEUR et al., 2013; LOMBARD et al., 2014). Através desta classificação, enzimas com diferentes mecanismos de ação ou com atividades cruzadas entre substratos foram identificadas com funções similares para a despolimerização de polissacarídeos e o modelo tradicional de degradação de polissacarídeos foi ajustado.

Recentemente, também foi adicionado ao CAZy a família de enzimas com atividade auxiliar (AA). Essa família contém enzimas com ação oxidativa em carboidratos e que participam da degradação ou modificação da lignina. A justificativa para inserção dessa nova família é que as enzimas lignolíticas geram radicais livres, altamente oxidativos, que são capazes de despolimerizar todos os componentes do material lignocelulósico, através da clivagem de ligações carbono-carbono (C-C) e também ligações éter. Além disso, os sistemas de degradação do material lignocelulósico estão intrinsecamente interligados. Por isso, é razoável a interpretação que a clivagem das enzimas oxidativas não seja restrita à degradação exclusiva da lignina, mas que ocorra concomitantemente também nos polissacarídeos (LEVASSEUR et al., 2013). As famílias CAZy estão agrupadas em classes conforme mostra Tabela 1.

⁸ www.cazy.org (“CAZy - Carbohydrate Active enZYme”, 2017).

Tabela 1 – Apresentação das classes de famílias CAZy descritas, sigla e principal função e o número de famílias depositadas no banco de dados.

CLASSES ¹	SIGLA	PRINCIPAL FUNÇÃO ^{1,2}	NÚMEROS DE FAMÍLIAS ^{2,3}
Glicosil hidrolases	GH	Hidrolisar e rearranjar ligações glicosídicas.	135
Glicosil transferases	GT	Formar ligações glicosídicas com fosfato em nucleotídeos ou com fosfato e lipídeos.	103
Polissacarídeo liases	PL	Clivar ligações glicosídicas de forma não hidrolítica, como os ácidos urônicos sofrem a β -eliminação.	24
Carboidrato esterases	CE	Clivar ligações éster em polissacarídeos, como a deacilação de xilanas.	16
Proteínas com atividades auxiliares	AA	Estimular processos oxidativos na lignina e nos polissacarídeos de forma direta ou indireta.	13
Módulo de ligação a carboidratos	CBM	Aderir as superfícies dos carboidratos.	81

Fontes: ¹(LOMBARD et al., 2014), ²(PAYNE et al., 2015), ³(“CAZy - Carbohydrate Active enZYme”, 2017).

Na hidrólise da celulose, as endoglucanases (GH5 à GH9, GH12, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74, GH124 e GH131) são as primeiras a iniciarem a despolimerização pelas frações amorfas de forma aleatória, expondo as ligações mais internas e criando novas pontas redutoras e não-redutoras, de forma processiva ou não. As exo-glucanases, também chamadas de celobiohidrolases das famílias GH6 e GH7, quando consideradas processivas, iniciam a clivagem na fração mais cristalina a partir das extremidades não-redutoras e redutoras, respectivamente. Essas enzimas, tem como produto de liberação a celobiose, a qual é clivada pelas enzimas β -glicosidases (GH1, GH3) à monômeros de glicose, reduzindo a inibição causada pela celobiose sob as exo-glucanases (GUERRIERO et al., 2015; HORN et al., 2012; SEGATO et al., 2014).

Recentemente, as enzimas previamente classificadas como endoglucanases da família GH61 foram renomeadas como *Lytic Polysaccharide MonoOxygenases (LPMO)* e, com a reformulação do CAZy, foram introduzidas na família AA9 (LEVASSEUR et al., 2013). Essas enzimas oxidativas foram adicionadas ao modelo de desconstrução da celulose, pois atuam de forma direta nas regiões cristalinas. A ação dessas enzimas ocorre através da

região planar de seu sítio ativo, a qual adere a superfície das regiões cristalinas da celulose. O mecanismo de reação envolve a redução do cobre presente em seu sítio catalítico, utilizando oxigênio como doador de elétrons, ocorrendo a formação de um radical intermediário (complexo superóxido) que oxida o carbono na região cristalina da celulose. Por isso, em presença de doador de elétrons, a atividade dessa enzima é aumentada, provendo a formação de novos sítios para ação das enzimas hidrolíticas. Alguns exemplos de moléculas que podem ser doadoras de elétrons são o oxigênio, o ácido ascórbico, o ácido gálico, a glutatona reduzida, os grupamentos fenólicos presentes na própria lignina e também através da enzima celobiose desidrogenase (CDH), pertencentes às famílias AA3 e AA8 (HORN et al., 2012; PHILLIPS et al., 2011).

O mecanismo de ação da enzima CDH é um exemplo da ação oxidativa indireta. Essas enzimas reagem com quinonas, íons metálicos ou corantes orgânicos e se tornam reduzidas, oxidando o terminal redutor da celobiose, celodextrinas e de celulose. Elas podem, ainda, reduzir o ferro na presença de peróxido, gerando radicais hidroxila com alto potencial oxidativo, através da reação de Fenton. Assim, interligando a degradação de lignina e de polissacarídeos da parede celular lignocelulósica (LEVASSEUR et al., 2013; PAYNE et al., 2015; PHILLIPS et al., 2011). Estas enzimas atuam colaborativamente com as enzimas hidrolíticas já citadas, conforme modelo representado na Figura 1.

Figura 1 - Modelo representativo de desconstrução da celulose, mostrando as principais enzimas hidrolíticas do modelo tradicional, juntamente com as enzimas oxidativas.

EG são endoglucanases, CDH são as celobiohidrolases, PMO 1 e 2 são os tipos de AA9, que oxidam o carbono C1 e C4, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Dimarogona, Topakas e Christakopoulos (2012)

O grande entusiasmo em relação ao aumento da hidrólise de celulose cristalina com as LPMOs, utilizando pouca quantidade de proteína, vem incentivando muitos estudos sobre essa classe de enzimas e gerando novos paradigmas para descobertas sobre mecanismos de degradação do material lignocelulósico. Um estudo propôs a subclassificação das LPMOs em três tipos, de acordo com a região onde atuam: o primeiro tipo oxida o carbono 1 (C1), o segundo tipo oxida o carbono 4 (C4) e o terceiro tipo oxida ambos os carbonos C1 e C4. Conforme o tipo de LPMO, poderia haver implicações no sinergismo e no aumento de hidrólise das regiões cristalinas, pois, assim, mais ou menos sítios de ligação seriam gerados para as celobiohidrolases. Há ainda a sugestão de que as enzimas AA9 possam oxidar o carbono 6 (C6) (HORN et al., 2012; LI et al., 2012). Um trabalho mais recente propõe que a interligação entre os sistemas LPMO e CDH seja improvável para a doação de dois elétrons na clivagem oxidativa de polissacarídeos. O cenário de oxidação proposto é a redução do cobre no sítio catalítico da LPMO, obtendo elétrons de um doador, posterior ligação e clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio para gerar o oxocomplexo e, finalmente, a clivagem do polissacarídeo (BISSARO et al., 2016). Outro estudo mostrou a descoberta e a caracterização de uma LMPO da família AA11, a qual possui semelhança estrutural com as LMPOs da família AA9 e AA10, e cliva quitina, oxidando o carbono C1 (HEMSWORTH et al., 2014).

Outras proteínas que não possuem ação hidrolítica ou oxidativa, como os CBMs também são consideradas no modelo de degradação dos materiais lignocelulósicos por fungos. A principal característica dos CBMs é a seletividade na adesão ao substrato e, assim, a contribuição para a atividade processiva. Em adição a isso, alguns tipos de CBMs apresentam funções especiais de romper a fração cristalina de forma não hidrolítica, o que sugere maior velocidade ao processo de degradação. O mecanismo de como isso ocorre ainda não está bem elucidado, mas alguns autores propõem que microfissuras presentes nas regiões cristalinas constituem-se em aberturas que permitem a penetração do CBM, provocando posterior quebra mecânica das microfibrilas e, assim, o surgimento de novas extremidades nas cadeias de celulose (ARANTES; SADDLER, 2010).

Já em relação a hidrólise das hemiceluloses, como exemplo de algumas das principais hidrolases que atuam na despolimerização da cadeia principal, tem-se: endo- β -1,4-xilanases (GH10, GH11), α -L-arabinofuranosídeses (GH3, GH43, GH51, GH54, GH62 e GH93), β -xilósídeses (GH1, GH3 e GH43), endo- β -1,4-mananases (GH5, GH7), xiloglucanases (GH12, GH44, GH74) conforme Figura 2. Entretanto, para a despolimerização total da

hemicelulose, faz-se necessário uma quantidade bastante variada de enzimas, tanto para clivar as diferentes unidades monoméricas que a compõe, quanto para clivar ligações entre lignina-polissacarídeos e pectina-hemicelulose, como as α -glucuronidasas (GH67, GH115), α -galactosidasas (GH27, GH36), acetil xilana esterases (CE1 a CE7) e feruloil esterases (CE1) (GLASS et al., 2013; HEUX et al., 2015; SEGATO et al., 2014).

Figura 2- Exemplos de enzimas necessárias para a despolimerização de diferentes tipos de hemiceluloses.

Fonte: Adaptado de Glass et al. (2013).

2.4 *Malbranchea pulchella*

Neste trabalho, foram adotadas duas das classificações existentes para fungos termofílicos. Segundo a classificação de Cooney e Emerson (1964) reportada por Johri, Satyanarayana e Olsen (1999), fungos termofílicos são aqueles que não apresentam crescimento em temperaturas abaixo de 20 °C (temperatura mínima de crescimento), mas

podem crescer em cerca de 50 °C. Uma outra classificação, proposta por Maheshwari et al. (2000) sugere que fungos termofílicos são aqueles que apresentam temperatura ótima de crescimento a 45 °C.

Diversos trabalhos indicam os fungos termofílicos como alvos potenciais na prospecção de enzimas para a degradação de biomassa. De fato, esses fungos possuem grande repertório de enzimas que com temperaturas ótimas superiores as de fungos mesofílicos. O principal interesse industrial é que, enzimas termoestáveis podem aumentar a eficiência da hidrólise da biomassa. Devido às altas temperaturas utilizadas, consegue-se diminuir a viscosidade do substrato e os riscos de contaminação em comparação aos bioprocessos mais brandos (BERKA et al., 2011; BLUMER-SCHUETTE et al., 2014; BUSK; LANGE, 2013; MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; SINGH et al., 2016; TURNER; MAMO; KARLSSON, 2007). Estudos envolvendo a maquinaria genética dos termófilos mostram que esses organismos evoluíram através de estratégias como seleção genética e aclimação funcional de seu mecanismo molecular. Para a adaptação em altas temperaturas, genes chaves foram modificados para um mecanismo de resposta mais rápido, sendo que os principais grupamentos modificados parecem estar concentrados nas funções de atividade catalítica e regulação de proteínas (WANG; CEN; ZHAO, 2015).

O fungo em estudo, *M. pulchella*, foi prospectado na Floresta Tropical, Mata Atlântica, Minas Gerais, Brasil, pelos autores Ribeiro et al. (2014a). A linhagem foi classificada de acordo com análises macroscópicas e está depositada na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. Estes mesmos autores avaliaram o extrato bruto produzido pelo fungo através de ensaios do halo de degração em meio sólido, contendo carboximetilcelulose (CMC) e xilana de *birchwood*, o qual mostrou melhores resultados a 50 °C. Foi também realizado um teste de inibição da atividade de xilanase e endoglucanase, adicionando concentrações crescentes de xilose e glicose (0-70 mM), mostrando uma ativação inicial dessas atividades nas concentrações menores desses monossacarídeos e, mesmo nas maiores concentrações, não houve perda de atividade por inibição. Os autores Ribeiro et al. (2014b) reportaram a clonagem, expressão heteróloga e a caracterização de uma xilanase da família GH10 de *M. pulchella*. Esta enzima, apresentou capacidade de hidrolisar cerca de 45% da xilana presente em bagaço de cana explodido e cerca de 20% da xilana de bagaço explodido e deslignificado em ensaios de hidrólise nas seguintes condições: temperatura de 55 °C por 5h, com consistência de sólidos de 1,5% (m/v) em 1,5 mL de reação, utilizando 0,5 nmol de enzima purificada. Os autores apontam que o resultado de

hidrólise de xilana em bagaço explodido foi melhor do que o obtido com o coquetel comercial IOC-4145 de xilanases produzido por *Thermomyces lanuginosus* (Novozyme).

Os autores Johri, Satyanarayana e Olsen (1999) fizeram um amplo levantamento sobre fungos termofílicos, incluindo várias linhagens da espécie *Malbranchea cinnamomea* demonstrando que ocorreu uma diversidade de nomenclaturas para *M. cinnamomea* durante o passar dos anos, as quais foram atribuídas conforme os autores que os estudaram. Dentre as nomenclaturas encontradas está uma linhagem denominada *M. pulchella*. Segundo Johri, Satyanarayana e Olsen (1999), as nomenclaturas são:

- *Geotrichum cinnamomeum* (Libbert. Saccardo – *Rev. Mycol.* 1882)
- *Thermoideum sulfureum* (Miehe – *Ber. Deutsch Bot. Ges.* 1907)
- *Malbranchea pulchella* (Saccardo – *Sydowia.* 1908)
- *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (Cooney & Emerson – *Thermophilic Fungi.* 1964)
- *Malbranchea sulfurea* (Miehe - Sigler & Carmichael – *Mycotaxon.* 1976)
- *Malbranchea cinnamomea* (Oorschot & de Hoog – *Mycotaxon.* 1984)

Ainda de acordo com Johri, Satyanarayana e Olsen (1999), *M. cinnamomea* é um fungo termofílico que possui temperatura mínima de crescimento a 25 °C, ótima a 45 °C e máxima a 57 °C. Suas colônias apresentam diâmetro de crescimento de 90 mm em meio peptona e extrato de levedura (PYE) em 7 dias de cultivo com mudança da coloração do meio ágar para um tom marrom escuro, devido a difusão de pigmentos. Suas hifas possuem colorações amarela, amarela-sulfurea e marrom escura. Seus esporos são classificados como artroconídeos, o tipo mais simples existente.

A taxonomia de *M. pulchella* também é um pouco incerta, principalmente em relação a ordem e a família. Estão disponíveis no banco de dados taxonômico do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e no repositório *Index Fungorum* as seguintes classificações:

- NCBI e GenBank⁹: *Ascomycota*> *Eurotiomycetes*> *Onygenales*> *mitosporic Onygenales*
- *Index Fungorum*¹⁰: *Ascomycota*> *Pezizomycotina*> *Leotiomycetes*> *Incertae sedis*> *Incertae sedis*> *Myxotrichaceae*

O trabalho de Morgenstern et al. (2012) revisou a taxonomia e reconstruiu uma árvore filogenética para 30 fungos descritos com comportamentos termofílico ou

⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>

¹⁰ <http://www.indexfungorum.org/>

termotolerante. Dentre os fungos estudados, *M. cinnamomea* foi um dos que apresentou novo posicionamento na árvore filogenética. Este estudo confirmou o posicionamento taxonômico de *M. cinnamomea* na família *Eurotiomycetes*, ordem *Onygenales*. Os mesmos autores fizeram uma nova árvore filogenética baseando-se nas sequências não codificantes do DNA ribossomal (rDNA), com as regiões de transcrição internas não codificadoras 1 e 2 (ITS 1 e ITS 2), consideradas o bloco gênico oficial de DNA para o estudo de filogenia de fungos inter e intraespécies (BELLEMAIN et al., 2010; SCHOCH et al., 2012). Através da árvore gênica construída com base na sequência intergênica ITS, os autores confirmaram que *M. cinnamomea* realmente pertence a ordem *Onygenales*. Além disso, nesta última análise, uma linhagem da espécie *M. pulchella* CBS 202.38 foi agrupada no mesmo clado com a espécie *M. cinnamomea* IFM 41309, mostrando que existe homologia entre essas espécies (MORGENSTERN et al., 2012).

Apesar da pouca informação existente sobre *M. pulchella* linhagem 6278, vários estudos mostraram o potencial enzimático de espécies sinônimas, dentre as quais a atividade de xilanase parece ser a mais expressiva. Os autores Matsuo e Yasui realizaram diversos estudos sobre as enzimas xilanolíticas (xilanases e β -xilosidases) de *M. pulchella* var. *sulfurea* e propuseram métodos de purificação (MATSUO; YASUI, 1985; MATSUO; YASUI; KOBAYASHI, 1977a, 1977b). Os autores Banerjee, Archana e Satyanarayana (1994) estudaram o metabolismo de xilose e as enzimas xilanolíticas secretadas por este fungo. Foi estudado também a característica de degradação de *M. pulchella* var. *sulfurea* em palha de trigo, o qual atingiu 17% (p/p) de perda de massa em 15 dias, e verificou-se que a atividade de celulasas (papel de filtro - FPU) foi maior quando o extrato enzimático era produzido em biomassa mais complexa em comparação com substratos mais simples como celulose de papel de filtro moída (JAIN; KAPOOR; MISHRA, 1979).

Dentre as linhagens sinônimas citadas, *M. cinnamomea* parece ser a melhor caracterizada sobre o potencial enzimático de degradação de material celulósico (BUSK; LANGE, 2013; MAIJALA et al., 2012; YANG et al., 2014). O fungo também possui genoma e proteoma sequenciados pelo grupo Genozyme¹¹. Dois trabalhos recentes do autor Mahajan reportaram o potencial hidrolítico por meio de testes de painel de atividade e hidrólises e, posteriormente, foi reportado o secretoma deste fungo, mostrando tanto o potencial hidrolítico como o oxidativo. Sobre o potencial hidrolítico foram identificadas endoglucanases, celobiohidrolases, xilanases, α -arabinofuranosidases e β -xilosidases. A

¹¹ https://www.fungalgenomics.ca/wiki/Malbranchea_cinnamomea_genome_released

adição na proporção 1:1 de secretoma deste fungo com o coquetel comercial Cellic Cetec 2 apresentou sinergismo na hidrólise de resíduos de talo de cenoura (*Parthenium hysterophorus*), já sobre o potencial oxidativo foi visto que, em presença de íons Mn^{2+} e Cu^{2+} , houve aumento da hidrólise do mesmo material (MAHAJAN et al., 2014, 2016).

Foram também realizados estudos de outras enzimas não CAZymes produzidas por espécies sinônimas ao fungo em estudo, reportando a produção e/ou atividade de lipases, protease, amilases e também do antibiótico penicilina (BHUVANESWARI UDAYA PRAKASH; GEETHA; UDAYA PRAKASH, 2011; HAN et al., 2013; SHOREIT; ISMAIL; MOHAMED, 2013; SINGH et al., 2016; VOORDOUW; ROCHE, 1975). Com isso, nós verificamos que há um grande potencial na avaliação do secretoma do fungo *M. pulchella* linhagem 6278 para a busca de novas CAZymes para aplicação na degradação da biomassa lignocelulósica.

2.5 ANÁLISE DO SECRETOMA

O funcionamento da regulação da expressão gênica é extremamente complexo e não possui uma hierarquia linear: um gene pode ser transcrito em seu RNA mensageiro (mRNAs) e este ser traduzido em proteína, no entanto, a quantidade do produto final será definido pelo nível de expressão gênica naquele organismo em um determinado momento, conforme estímulo externo. Uma maneira para se fazer o estudo dos sistemas biológicos de forma mais fácil é a divisão dos diferentes componentes dos eventos moleculares em subpopulações chamadas de ômicas (GREENBAUM et al., 2001; GYGI et al., 1999). O processo para análise das informações ômicas geralmente é realizado de forma comparativa, entre as subpopulações e o genoma anotado. Assim, o resultado das tecnologias ômicas reflete apenas o genoma funcional, que compreende as propriedades e funções dos genes de um organismos. Portanto, a análise conjunta de pelo menos 2 dessas tecnologias é útil para se ter um melhor entendimento do comportamento celular (HEUX et al., 2015).

A proteômica é o estudo de todo o conjunto de proteínas produzidas por um organismo em determinadas condições do estado celular em resposta a uma fase do crescimento e/ou a condições ambientais. Alterações transcricionais, por *splicing* alternativos, e modificações pós-traducionais (como a fosforilação, glicosilação, metilação, entre outras), fazem com que a proteômica seja uma fonte rica e complexa de informações do metabolismo. Aproveitando a característica natural dos fungos filamentosos de secretar

proteínas através de sua maquinaria especializada, um grupo de moléculas de interesse industrial, como as CAZymes, tem sido selecionado como foco de muitos trabalhos. Alguns autores chegam até a mencionar o CAZome como uma subpopulação ômica. Neste sentido, o estudo do perfil das proteínas secretadas ou exosecretoma, consiste na identificação e predição destas proteínas em um dado momento em uma determinada condição, evidenciando o estímulo (indutor/repressor) que causou a expressão dos genes e produção das proteínas (AGUILAR-PONTES; DE VRIES; ZHOU, 2014; HEUX et al., 2015; KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007).

A concentração de proteínas codificadas por genes ativos é dependente da concentração dos mRNA maduros correspondentes a sua produção e dos mecanismos de tradução e transporte de proteínas. Já a transcrição gênica é baseada em uma resposta do meio e depende da quantidade de estímulos recebidos, da ação de proteínas chave e de fatores de transcrição, conforme representado na Figura 3. Entende-se que o transcriptoma está relacionado aos fatores transcricionais que são recrutados em resposta a um estímulo e, assim, gerando moléculas de mRNA em resposta a um sinal extracelular (GREENBAUM et al., 2001; GREENBAUM; JANSEN; GERSTEIN, 2002; HEUX et al., 2015).

Figura 3- Esquema representativo do controle celular e expressão gênica de acordo com sinal recebido do ambiente.

Fonte: Adaptado de Alberts et al. (2008).

Em relação aos métodos de análise do secretoma de fungos filamentosos, a espectrometria de massas se apresenta como a opção mais comumente utilizada, pois garante ótima precisão nos resultados e possibilidade de aplicação em diferentes tipos de amostras. Dessa forma, os resultados são obtidos pela comparação entre as massas já determinadas e depositadas em banco de dados específicos e o resultado da relação massa/carga (m/z) de cada espécie molecular analisada (FEIST; HUMMON, 2015). Existem pelo menos 3 tratamentos comumente utilizados nos trabalhos de proteômica e que antecedem a análise espectrométrica: *bottom-up* clássica, *shotgun* e *top-down*. A primeira consiste na digestão proteolítica da amostra por tripsina e posterior análise por espectrometria de massas para determinar a massa de peptídeo rastreável (*peptide mass fingerprint* - PMF) e as sequências dos fragmentos de peptídeos. Já a proteômica por *shotgun* envolve também a digestão de um complexo proteico bastante diverso nos tamanhos das moléculas, as quais passam por uma separação eletroforética através da cromatografia de capilaridade acoplada em um espectrômetro de massas (LC-MS/MS). O método *top-down* é baseado na fragmentação de moléculas intactas e posterior análise por espectrometria de massas (AGUILAR-PONTES; DE VRIES; ZHOU, 2014).

A etapa de preparo de amostra é crucial para a análise proteômica, principalmente para proteínas intracelulares. Já para análise do secretoma, o preparo da amostra enfrenta outras dificuldades que não a lise celular, mas sim a contaminação por compostos diversos presentes no meio, pela degradação do substrato, pelo metabolismo do fungo ou pelo método de extração de proteínas. Muitos trabalhos têm indicado a necessidade de preparo e purificação de amostra de proteínas anterior às etapas de análise, mas, sabe-se que, toda purificação envolve perdas e, no caso da proteômica global, pode haver perda de proteínas menos abundantes. Algumas das sugestões encontradas por alguns autores são tratamento com ácido tricloroacético (TCA), método de purificação e concentração mais utilizado. Uma combinação de TCA com acetona também vem sendo utilizada com frequência. Outros métodos bastante utilizados que possuem uma eficiência similar para uma variedade de amostras são: clorofórmio-metanol, acetato de etila, polímeros catiônicos ou não iônicos, ultrafiltração, entre outras técnicas mais caras como o *salting out* com posterior cromatografia hidrofóbica. Já o método de separação de moléculas mais amplamente utilizado é a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 1D ou 2D (SDS-PAGE), o qual separa a mistura de proteínas por peso molecular (1D) e ponto isoelétrico (2D), auxiliando no preparo da amostra, anterior a análise por LC-MS/MS (BHADAURIA et al.,

2007; FEIST; HUMMON, 2015; JIANG; HE; FOUNTOULAKIS, 2004; KIM; NANDAKUMAR; MARTEN, 2007).

O aperfeiçoamento de técnicas de sequenciamento beneficiou o desenvolvimento e a disponibilização das informações *ômicas* em banco de dados, gerando, assim, uma quantidade expressiva de entradas de novas proteínas, inclusive CAZymes (secretoma), e sequências de transcritos (transcriptoma). As vantagens da combinação dessas informações em termos de aplicação são: a confirmação de anotações de genomas já realizadas ou a criação de novas anotações, a identificação de novas enzimas como alvo para clonagem e expressão heteróloga e a criação de novos coquetéis enzimáticos (*cell factories*). Isso exemplifica como estas técnicas se complementam e evidencia a importância da análise por diferentes técnicas ômicas para um entendimento mais global do potencial dos fungos. Este entendimento se expande também a áreas que estudam o potencial enzimático para aplicação em biorrefinarias, com a finalidade de encontrar enzimas chave mais ativas e estáveis (AGUILAR-PONTES; DE VRIES; ZHOU, 2014; DELMAS et al., 2012; GUERRIERO et al., 2015; SIBTHORP et al., 2013).

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho, foi analisar o secretoma do fungo termofílico *Malbranchea pulchella* linhagem 6278 quando cultivado em biomassa “não-lignificada” (polpa Kraft) e lignificada (eucalipto), como fonte única de carbono, e caracterizá-lo segundo as CAZymes produzidas.

Para atingir o objetivo, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Avaliação do crescimento do fungo *M. pulchella* segundo o efeito da temperatura, pH e de diferentes fontes de carbono.
- Avaliação *in vitro* da capacidade de biodegradação do fungo quando cultivado em polpa Kraft e eucalipto, como fonte única de carbono.
- Caracterização dos materiais *in natura* e biodegradados pelo fungo em termos de perda de massa e teor de componentes.
- Produção de secretoma e análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS) do perfil proteico.
- Caracterização do secretoma, segundo as CAZymes produzidas, em termos de capacidade hidrolítica e oxidativa.
- Análise da região intergênica (ITS) para avaliação da semelhança e homologia com outras espécies do gênero *Malbranchea sp.*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Neste estudo, foi utilizado o fungo ascomiceto *Malbranchea pulchella* linhagem 6278, a qual foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Rolf A. Prade da *Oklahoma State University* (Stillwater, OK-USA).

Foram utilizadas para comparação nos estudos de crescimento duas linhagens de ascomicetos:

- *Aspergillus fumigatus* linhagem RP-2014, também gentilmente cedida pelo professor Dr. Rolf A. Prade da *Oklahoma State University* (Stillwater, OK-USA).
- *Trichoderma reesei* linhagem RUT C30, a qual foi gentilmente cedida pela professora Dra. Maria Bernadete Medeiros, repicada em meio batata-dextrose-água (PDA) e mantida a 4 °C.

As linhagens de *M. pulchella* e *A. fumigatus* foram conservadas em solução estoque composta por 20% de glicerol e 10% de lactose, mantidas a -80 °C

4.2 Meios de cultivo

A manutenção de *M. pulchella* foi realizada através da repicagem em meio básico (MB) em placas de Petri, cuja composição foi: 5,0% (v/v) solução de sais, 0,1% solução de elementos traços, 0,1% (v/v) de *mix* de vitaminas 1000x (*Vitamin Kit* – Sigma Aldrich), 0,5% (p/v) triptona e 2,0% (p/v) de ágar. A composição das soluções utilizadas está descrita no Anexo A. O pH do meio foi inicialmente ajustado para 7,0. Esse meio foi utilizado tanto nas versões sólida (MB-ágar) e líquida (MB) (SEGATO et al., 2012). Ao longo do trabalho, foram acrescidas diferentes fontes de carbono ao meio MB, em diferentes percentuais. Para o meio de manutenção, foi acrescido ao meio MB-ágar 2,0% de glicose (p/v).

Para a repicagem no meio de manutenção, MB-ágar acrescido de glicose, foram utilizados 10 µL da solução estoque de esporos e, com o auxílio de uma alça de platina flambada, foi realizada estriagem ao longo de toda a placa para a propagação da cultura. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por um período máximo de 3 semanas. Após este período, as placas eram mantidas a 4 °C para serem utilizadas posteriormente.

Para fins de inóculo, uma suspensão de esporos foi preparada através da raspagem total de uma placa de Petri, contendo o repique em meio de manutenção, para isso, foi

utilizado 10 mL de água destilada estéril. A suspensão obtida foi filtrada a vácuo em funil de Buchner com membrana do tipo Miracloth (Calbiochem) e a suspensão resultante foi contada em Câmara de Neubauer e continha cerca de 1×10^6 esporos.mL⁻¹.

4.3 Avaliação do crescimento

Para a avaliação do crescimento, *M. pulchella* foi inoculado em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro), contendo meio MB-ágar, através do método de inoculação em um ponto (*spot inoculation*) adaptado de (FUSTIER et al., 1998). O método realizado consistiu na utilização de palitos de dente, lavados com água destilada e autoclavados, os quais foram utilizados para raspar superficialmente uma placa já propagada com o fungo. O palito com os esporos do fungo em apenas uma de suas extremidades foi utilizado para inocular um ponto central da placa de Petri contendo o meio de cultura a ser testado. A vantagem da adaptação do método foi a redução de escape de esporos na inoculação.

A medição do diâmetro das colônias foi realizada com régua em duplicada com orientação perpendicular entre as medidas, sendo considerada a média desses valores (PIRT, 1973; SMITH, 1924; TRINCI, 1971). O intervalo mínimo de medição foi de 1 dia e máximo de 18 dias de incubação. Todos os meios para avaliação de crescimento foram incubados no escuro, sendo levados para luz apenas para a realização da medição. Todos os testes foram realizados em triplicata biológica para cada condição. A taxa média de crescimento foi calculada com a medida do diâmetro da colônia pelo número de dias de incubação. Regressões lineares foram realizadas para determinar a velocidade de crescimento da colônia e os respectivos coeficientes de correlação dos modelos lineares foram obtidos.

Para avaliar o efeito da temperatura no crescimento, foram realizadas medições do diâmetro das colônias do fungo nas seguintes temperaturas de incubação: 27 °C, 37 °C, 45 °C e 55 °C, em meio MB-ágar, pH 7,0, acrescido de glicose. Para determinação do efeito da temperatura no crescimento, foi realizada regressão polinomial e o coeficiente de correlação do modelo polinomial foi obtido.

Para a comparação da termolorância entre os ascomicetos *A. fumigatus* e *T. reesei*, foram realizadas medições do diâmetro das colônias dos fungos nas seguintes temperaturas de incubação: 27 °C, 37 °C, 45 °C e 55 °C, em meio com extrato de batata-dextrose-ágar (PDA).

Para avaliar do efeito do pH no crescimento, foram realizadas medições do diâmetro das colônias do fungo incubado a 37 °C e variando o pH entre 4,0-8,0 (com incrementos variáveis de 0,5 ou 1,0). Foi realizada uma segunda avaliação do efeito do pH, estabelecendo a temperatura de incubação a 45 °C e variando o pH entre 6,0-7,5, com incrementos de 0,5.

Para avaliação do efeito da fonte de carbono, o fungo em estudo foi inoculado em placas de Petri pequenas (6,0 cm) em meio MB-ágar, pH 7,0, acrescido de 0,5% (m/v) da fonte de carbono testada e incubado a 45 °C por 5 dias. Foram testadas 18 fontes de carbono: 1- galactomanana (*locust bean gum*), 2- carboximetilcelulose (CMC), 3- glicose, 4- quitosana, 5- liquenana, 6- arabinoxilana (*rye*), 7- β -glucana, 8- arabinana sem ramificação (*sugar beet*), 9- xilana (*larch wood*), 10- xiloglucana (*tamarind seed*), 11- arabinana (*sugar beet*), 12- galactomanana, 13- xilana (*beech wood*), 14- avicel, 15- polpa de celulose, 16- eucalipto, 17- ácido poligalactourônico, 18- arabinogalactana lariço (*larch*). Informações sobre as fontes de carbono são encontradas no material suplementar (apêndice A). A avaliação de crescimento foi realizada qualitativamente e foi classificada como positiva, quando ocorreu a germinação de colônia, ou negativa em ausência de germinação. Um meio sem fonte de carbono e um sem fonte de carbono e nitrogênio (triptona) foram utilizados como controles positivos para esta avaliação.

4.4 Materiais lignocelulósicos e preparo para utilização no cultivo

Como modelo de material “não-lignificado” (pouco lignificado), foi utilizada polpa Kraft branqueada, gentilmente cedida pela empresa Fibria Celulose S/A (Jacaré – SP). Para utilização como substrato nos cultivos, a polpa Kraft foi pesada segundo quantidade em base seca, sem ajuste da umidade, pois o teor de umidade inicial continha cerca de 70% (m/m). Onde se lê o uso de polpa Kraft ao longo do trabalho (cultivo e hidrólise), entende-se polpa Kraft branqueada.

Como modelo de material lignificado, foram utilizados cavacos de eucalipto, gentilmente cedidos pela Votorantim Celulose e Papel (Fibria). Para uso como substrato, o eucalipto foi moído em moinho de facas com malha de 20 *mesh* e lavado sucessivamente com etanol 95% em Soxhlet por 6 h para retirada de extrativos. O eucalipto preparado para cultivo continha teor de umidade de cerca de 10% (p/p). Onde se lê o uso do eucalipto como biomassa para cultivo, entende-se eucalipto moído e lavado com etanol 95%.

4.5 Avaliação de biodegradação

Para avaliação de biodegradação, foi realizado cultivo semi-sólido com consistência de 14,3% (p/v) adaptado de Saykhedkar et al. (2012). Foram pesadas 3,0 g de biomassa base seca em Erlenmeyer de 250 mL e adicionados 15,0 mL de meio básico (MB) com pH ajustado para 7,0. A umidade do cultivo com polpa Kraft não foi ajustada. Já para o eucalipto, foi adicionado 6,0 mL água destilada, para correção da umidade. Foi realizada etapa de autoclavagem a 121 °C por 15 minutos e os cultivos foram reservados *overnight* para garantir hidratação da biomassa. Os cultivos foram inoculados com 10^6 esporos e incubados à 45 °C pelo período que variou de 7, 14, 21 e 60 dias, permanecendo estáticos. Foi realizada triplicata biológica para cada condição e triplicata de controle negativo por 21 dias de incubação.

Para remoção de parte do micélio aderido à biomassa resultante da biodegradação, foram adicionados 100,0 mL de água destilada aos cultivos e agitou-se manualmente. A suspensão foi transferida para uma proveta de 2 L já contendo 500,0 mL de água. A extremidade da proveta foi tampada e foi agitada por inversão, cinco vezes consecutivas. A suspensão foi filtrada em uma malha de 200 *mesh* e os sólidos retidos foram lavados com 500,0 mL de água destilada adicionais. Os sólidos retidos na malha foram secos a 40 °C *overnight*, pesados e a umidade foi determinada.

Para determinação da umidade dos materiais, aproximadamente 0,5 g foram pesados em balança de umidade Ohaus (modelo MOC-120H) com o protocolo selecionado para secar amostras incubando à 105 °C por um período de 20 minutos, no caso de amostras secas, e um período de uma hora para amostras úmidas. A partir da razão entre as massas em base seca finais e iniciais do cultivo no período avaliado, obteve-se o Rendimento de Sólidos Insolúveis (RSI), o qual representa o percentual em massa do substrato não mineralizado.

4.5.1 Caracterização química dos materiais

Para determinação do teor de extrativos, tanto os materiais *in natura* como os biodegradados foram moídos em moinho de facas com malha de 20 *mesh*. Foi utilizado 1,0 g em base seca dos materiais moídos foram armazenados em envelopes de papel filtro, os quais foram submetidos à extração através de sucessivas lavagens com etanol 95% por 6h em Soxhlet. Os envelopes foram secos à temperatura ambiente por cerca de dois dias e,

posteriormente, tiveram a massa e umidade determinadas. O teor de extrativos foi obtido pela diferença entre a massa final e inicial em base seca (FERRAZ, 2000).

Para determinação do teor de componentes dos materiais *in natura* e biodegradados, os mesmos foram secos até apresentarem teor de umidade aproximada de 10% (m/m). Esse material passou por hidrólise com ácido sulfúrico 72% (p/p) em duas etapas. Primeiramente, 0,300 g de material em base seca sem extrativos foram pesados e 3,0 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p) foram adicionados e incubado por uma hora a 30 °C seguida de sucessivas agitações com bastão de vidro a cada 15 minutos. O volume do hidrolisado foi ajustado para 250,0 mL com água destilada. Em uma segunda etapa de hidrólise, a mistura foi autoclavada por uma hora a 121 °C. Após ser resfriado, o hidrolisado passou por filtração em vidro sinterizado com porosidade número 3 (previamente secos em estufa a 105 °C). O material retido no filtro correspondeu à lignina insolúvel em ácido (lignina Klason), sendo esta determinada através da massa seca presente no filtro. O volume do hidrolisado filtrado foi ajustado para 200,0 mL e o teor de lignina solúvel em ácido foi determinado através da leitura da absorbância a 205 nm a partir de amostras do hidrolisado diluídas 10X. Foi utilizado como padrão para cálculo da concentração de lignina solúvel a absorvidade de 105 L.g⁻¹.cm⁻¹ (FERRAZ, 2000).

Para determinação do teor de polissacarídeos estruturais, uma alíquota do hidrolisado foi preparada através de filtração em cartuchos do tipo SEP-PACK C18 para a retenção de compostos fenólicos. Os teores de carboidratos foram determinados através de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna BIORAD AMINEX HPX – 87H, com eluente ácido sulfúrico 5 mM a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e detecção por índice de refração (*Refractive index detector*, Waters, modelo 2414). A concentração dos carboidratos do tipo glucana, xilana e arabinosil foram calculadas através de curvas padrão de calibração para cada açúcar (glicose, xilose e arabinose), da mesma forma também foi calculada a concentração de grupos acetil (FERRAZ, 2000). A caracterização de todos os materiais em triplicata encontra-se no material suplementar (apêndice B).

4.5.2 Análises de microscopia dos materiais resultantes da biodegradação

Para análise de microespectroscopia-ultravioleta (UV), foram utilizadas sondas nos cultivos semi-sólidos com eucalipto. Dois pedaços de cavaco de eucalipto com cerca de 2

cm foram lavados com etanol 95% e autoclavados juntamente com os cultivos nos períodos de 7, 14 e 21 dias. As sondas foram lavadas com água destilada ao final de cada período e preparadas para serem impregnadas com resina através de sucessivas imersões em soluções de concentração crescente de acetona (25%, 34%, 50%, 66%, 75% e 100% (p/p)), trocadas a cada 20 minutos. As sondas permaneceram *overnight* em solução de acetona 100% para garantir sua desidratação. Foi realizada etapa de infiltração com resina SPURR *low viscosity* (kit EM 0300), preparada conforme instrução do fabricante Sigma Aldrich. Para a infiltração, foram realizadas imersões em mistura de concentração crescente de resina (25%, 34%, 50%, 66%, 75% e 100% (v/v)), trocadas diariamente. As sondas imersas em resina foram bloqueadas em uma bandeja de silicone, evitando a formação de bolhas de ar, e incubadas a 70 °C por 48 h até a secagem da resina. Os blocos formados foram desbastados com lâminas de vidro e, posteriormente, com lâmina de diamante. Ao menos 2 lâminas das sondas do cultivo e controle foram cortadas para análise.

Para visualização das paredes celulares vegetais, foi utilizado microscópio Zeiss Imager A2m e, para capturar imagens das lâminas, foi utilizado o *software* Tidasvision. Cerca de 40 espectros UV foram capturados das paredes secundárias vegetais de cada amostra através do *software* Tidasdaq. A média dos espectros, tanto de amostras do cultivo quanto do controle, foram utilizadas para análise de picos de absorção nos comprimentos de onda da região UV. As análises foram realizadas no Laboratório de Ciências da Madeira do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. André Ferraz, segundo metodologia interna.

Para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras da biomassa resultante dos cultivos de polpa Kraft e eucalipto nos períodos de biodegradação de 7, 14 e 21 dias e controles (21 dias), previamente lavados com água destilada, foram utilizadas para análise qualitativa da superfície do material. Para isso, as amostras foram fixadas sobre uma placa de aço sobre uma fita de carbono e uma fina camada de ouro de aproximadamente 20 nm foi aplicada através de metalizadora MED020 (BAL-TEC /MCS MULTICONTROL SYSTEM). As amostras impregnadas com ouro foram armazenadas *overnight* em dessecador. As imagens de MEV foram obtidas em um equipamento LEO 1450VP Trademark LEO Co. LTD, empregando um sinal de elétrons secundários, uma voltagem de 20kV. As análises foram realizadas no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena, em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Durval Rodrigues Junior, segundo metodologia interna.

4.5.3 Produção de proteínas em cultivo semi-sólido, extração de enzimas e eletroforese SDS-PAGE

Reportamos, aqui, a metodologia desenvolvida de produção de proteínas em meio semi-sólido e preparo de amostra para análise de secretoma. Entretanto, devido a dificuldades no preparo de amostras para análise de espectrometria de massas, decidiu-se dar continuidade ao trabalho por meio da produção de proteínas em meio submerso. Previamente, haviam sido feitos cultivos semi-sólidos para produção de proteínas em uma escala maior, pois era planejado realizar o estudo do secretoma e avaliação de biodegradação conjuntamente.

Foi seguido procedimento semelhante ao item 4.5. Considerando o aumento de escala para produção de maior quantidade de extrato proteico, foram pesadas 10,0 g de biomassa base seca em Erlenmeyer de 1 L e adicionados 50,0 mL de meio básico (MB) com pH ajustado para 7,0. A umidade do cultivo com polpa Kraft não foi ajustada. Já para o eucalipto, foi adicionado 20,0 mL de água destilada, para correção da umidade, mantendo a consistência final do meio em 14,3% (p/v) de sólidos, segundo metodologia adaptada de Saykhedkar et al. (2012).

Para extração das proteínas, 40 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), contendo 0,01% de Tween 60 e 1 mM de inibidor de protease (Fluoreto de fenilmetilsulfonila – PMSF) foram adicionados a cada uma das triplicatas biológicas e deixadas sem agitação *overnight* (cerca de 16h) a 10 °C. Foi realizada uma segunda etapa de extração sob agitação de 120 rpm por quatro horas a 10 °C. O sobrenadante foi separado do extrato bruto enzimático por filtração a vácuo, utilizando filtro de vidro sinterizado de porosidade 4 (10-16 µm) para extrato produzido com polpa Kraft e funil de Buchner contendo três membranas do tipo Miracloth (Calbiochem) para meio com eucalipto. A diferença de métodos de filtração foi devido ao maior entupimento dos filtros de vidro sinterizados de porosidade 4 com os cultivos em eucalipto. Para garantir a separação entre o sobrenadante e a biomassa, foi realizada uma centrifugação por 30 minutos com rotação a 4500 rpm a 4 °C.

Como preparo de amostra para aplicação em eletroforese SDS-PAGE, os extratos recuperados foram concentrados com dispositivos de ultrafiltração Vivaspin (GE Healthcare Life Science), com membrana de corte de 3 kDa, resultando em amostras cerca de 20X concentradas. Foi realizada dosagem de proteínas totais, conforme item 4.6, e uma quantidade padrão de 10 µg dos extratos concentrados foram aplicadas na eletroforese SDS

–PAGE (concentração do gel separador 10%) (PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2006; SHAPIRO; VIÑUELA; V. MAIZEL, 1967). Outros métodos de preparo de amostras foram também testados, tais como: a precipitação de proteínas com ácido tricloroacético 10% (v/v), a precipitação com acetona à 4 °C e a filtração com cartuchos do tipo SEP-PACK C18.

Para avaliação da atividade dos principais grupos de enzimas relacionadas à degradação de celulose e hemicelulose, foram escolhidos os substratos modelos: avicel, carboximetilcelulose (CMC), xilana *beechwood* e galactomanana (*locust bean gum*) para dosagem de celobiohidrolases, endoglucanases, xilanases e mananases, respectivamente. Foi realizada uma metodologia com volume de reação em microescala (1 mL volume final), devido à quantidade reduzida de amostra. Para a reação, foram utilizados 10 µL do extrato concentrado, 240 µL de solução tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e 250 µL de solução dos substratos preparados em água nas seguintes concentrações: 1% (p/v) para avicel, CMC e xilana e 0,5% (p/v) galactomanana. A reação foi incubada à 50 °C por uma hora e a quantificação de açúcares redutores foram dosados com adição 500 µL de solução de DNS e incubados a 95 °C por 5 minutos, pelo método de Miller (1959). A absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de açúcar redutor em $\mu\text{mol}.\text{mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ foi considerada 1 U.mL⁻¹. Informações sobre os substratos modelos são encontradas no material suplementar (apêndice A).

4.6 Determinação de concentração total de proteínas

Para dosagem de proteínas totais, foi utilizado 40 µL do reagente *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad), em um volume final de 200 µL, diluindo as amostras em água destilada. A leitura foi realizada a 595 nm em leitor de microplacas TECAN Infinity M200. Albumina de soro bovina (BSA) foi utilizada como padrão de proteínas.

4.7 Análise do secretoma de *M. pulchella* em condição de indução pelo substrato

4.7.1 Produção de proteínas em meio submerso

Foram testadas algumas formas de produção de proteínas, tais como: produção de proteínas em cultivo submerso, contendo 2% (p/v) de biomassa seca em meio MB, e em cultivo semi-sólido, contendo 14,3% (p/v) de biomassa seca. Ambas as formas de produção

de proteínas, geraram amostras com grande acúmulo de interferentes após o procedimento de concentração. Esses interferentes (compostos fenólicos e produtos de degradação da biomassa) causavam arrastes, quando as amostras eram analisadas por SDS-PAGE, impedindo a definição das bandas de proteínas desejáveis para análise por espectrometria de massas. Optou-se pela produção de proteínas em um cultivo com menor teor de sólidos, para reduzir a quantidade de compostos interferentes solubilizados no extrato enzimático.

Para a produção de proteínas em meio submerso, foram inoculados 10^7 esporos em um pré-cultivo com 1% (p/v) de glicose em 250 mL de meio MB, pH inicial 7,0, incubado a 45 °C por 48 h com agitação de 120 rpm, para obtenção de massa micelial. O micélio resultante foi coletado através de filtração a vácuo em funil de Buchner, contendo três membranas do tipo Miracloth (Calbiochem). O micélio foi lavado com cerca de 300 mL de água destilada para remoção da glicose residual e transferido para novos cultivos contendo 250 mL de meio MB, pH 7,0 suplementado com 0,5% (p/v) de biomassa em base seca: polpa Kraft, eucalipto e glicose, para produção do secretoma em condição de indução pelo substrato, como fonte única de carbono. Os cultivos foram incubados a 45 °C por 72 h com agitação de 120 rpm. Todos os cultivos foram realizados em triplicata biológica e foram realizados controles negativos também em triplicata.

Para acompanhamento do pré-cultivo, foi determinada a densidade celular produzida após 48h. A massa micelial resultante foi filtrada em funil de Buchner, contendo três membranas do tipo Miracloth (Calbiochem) e pré-seca em estufa a 45 °C *overnight*. A secagem prosseguiu em estufa a 105 °C e o peso seco foi acompanhado até massa final constante. Para acompanhamento dos cultivos em condição de indução pelo substrato, foram retiradas alíquotas de cerca de 2,0 mL a cada 12 h. Nessas alíquotas foram realizadas dosagem de açúcar redutor e dosagens de proteínas totais. Para a dosagem de açúcares redutores remanescentes no cultivo foi utilizado 100 µL de sobrenadante do cultivo (extrato bruto) e 100 µL DNS incubados a 95 °C por 5 minutos, pelo método de Miller (1959). A absorbância das amostras e dos controles foram lidas a 540 nm em leitor de microplacas TECAN Infinity M200. Para a dosagem de proteínas totais, foi realizada metodologia conforme item 4.6.

4.7.2 Recuperação e concentração dos secretomas em condição de indução pelo substrato

Para recuperação dos secretomas após cultivo de 72h, foi realizada filtração a vácuo em funil de Buchner, contendo três membranas do tipo Miracloth (Calbiochem). Os sobrenadantes foram clarificados através de filtrações sucessivas com filtros de porosidade cada vez menor, variando de 40 μm (filtro sinterizado com porosidade nº 3) a 0,45 μm (filtro de membrana de poliétersulfona - PES) e o pH final do secretoma foi determinado. Os secretomas foram concentrados em célula de ultrafiltração com agitação Amicon *Stired Cell* (Millipore), utilizando membrana Biomax (Millipore), com corte de 10 kDa. Foram realizadas dosagens de proteínas totais tanto no volume eluído quanto no volume concentrado, conforme item 4.6. O volume final de cerca de 30 mL de cada secretoma foi ainda concentrado com dispositivos de ultrafiltração Vivaspin (GE Healthcare Life Science), com corte de 10 kDa, até um volume final de cerca de 3 mL, cerca de 100X concentrados em relação ao extrato bruto. Os secretomas foram dialisados com tampão citrato (pH 4,8) 50mM, para remoção de açúcares redutores. A quantidade de 15 μg de proteínas de cada secretoma foi padronizada para corrida em SDS-PAGE (concentração do gel separador 12%) (PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2006; SHAPIRO; VIÑUELA; V. MAIZEL, 1967). O gel resultante foi corado com azul brilhante de comassie e a imagem do perfil proteico resultante foi capturada pelo equipamento Gel Doc XR (Bio Rad), *software Image Lab* (Bio Rad).

4.7.3 Preparo de amostra para espectrometria de massas e identificação de proteínas

As proteínas foram excisadas dos géis de eletroforese em 78 amostras, as quais foram selecionadas de forma visual e equalizada de acordo com a intensidade de banda. Foram selecionados fragmentos maiores de géis, quando apresentavam menor intensidade de banda, e fragmentos menores, quando apresentavam com maior intensidade de banda. As etapas de seleção de amostras nos géis até o sequenciamento de peptídeos das amostras foram desenvolvidas em colaboração com o laboratório multiusuário do Laboratório Nacional de Biociências do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNBio-CNPEN, Campinas-SP), conforme metodologia interna.

A extração de proteínas dos géis e obtenção da mistura de peptídeos foi adaptada da metodologia de Shevchenko et al. (1996). As 78 amostras excisadas dos géis foram

fragmentadas em pedaços menores (cerca de 1 mm) para melhorar a eficiência da extração das proteínas. As amostras foram tratadas com solução descorante (50% metanol, 2,5% ácido acético) para remoção do corante comassie brilhante e foram desidratadas com acetonitrila 100%. Foram executadas etapas de redução das pontes dissulfeto, alquilação das cisteínas e desidratação, com o objetivo de extrair as proteínas dos géis de eletroforese. As amostras foram digeridas com cerca de 600 ng de tripsina (Promega) e incubadas a 37 °C *overnight* e uma mistura de peptídeos foi extraída. Essa mistura foi evaporada e ressuspensa em ácido fórmico 0,1% em volumes finais de aproximadamente 15 µL, conforme concentração de proteínas presente.

Para análise da mistura de peptídeo, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) em um espectrômetro de massas Q-TOF Premier (Waters) com fonte de íons *nanospray* adaptada de Aragão et al., (2012). 4,5 µL da mistura de peptídeos foram separados em um sistema de cromatografia líquida, da seguinte maneira: os peptídeos passaram por uma coluna 2G-VMTrap de 5µm (180µm x 20mm) e a seguir foram eluídos da coluna analítica BEH C18 (130 Å; 1,7µm x 100µm x 100 mm), utilizando um gradiente de 2 – 30% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico por 30 minutos em um fluxo de 0,6 µL.min⁻¹. A voltagem do capilar foi de 3,5 kV, do cone foi de 30Kv e temperatura da fonte de 80 °C. A aquisição dos dados foi realizada através do modo de operação “*TOP TREE*”, que consiste na aquisição de um espectro MS acompanhada por eventos de fragmentação MS/MS dos três picos mais intensos detectados. Para aumento da eficiência de fragmentação, foi utilizado um método de exclusão dinâmica dos íons mais intensos por 60 segundos. As corridas foram analisadas pelo *software* MassLynx v.4.1 (arquivos .raw) e processados pelo *software* Mascot Distiller/Mascot Daemon (Matrix Science Ltd.) (arquivos .mgf).

A busca e identificação de peptídeos foi realizada através do *software* Mascot (Matrix Science, London, UK; versão 2.3.02.), utilizando como base três bancos de dados diferentes, pois não há genoma ou proteoma sequenciado do fungo em estudo. Dois dos bancos de dados são públicos: Uniprot Swiss-prot¹² (550.299 sequências; 196.347.838 resíduos) e MycoClap¹³ (849 sequências; 398.598 resíduos) e, um banco de dados utilizado foi sequenciado pelo grupo Genozymes¹⁴, *Bioproducts and Bioprocesses Development Project* (9074 sequências; 3.927.967 resíduos), proteoma de *M. cinnamomea* CBS 343.55. As

¹² Uniprot Swiss-prot - <http://www.uniprot.org> (WASMUTH; LIMA, 2017)

¹³ MycoClap - <https://mycoClap.www.fungalgenomics.ca> (MURPHY et al., 2011)

¹⁴ Genozymes - <http://www.fungalgenomics.ca>

leituras dos bancos de dados foram realizadas tanto na ordem direta como na reversa (*decoy*) para estimar a taxa de falsos positivos (FDR). Como parâmetros de busca foram consideradas: modificação fixa de carbamidometilação da cisteína (+57Da), modificação variável de oxidação da metionina (+15Da); uma clivagem perdida pela enzima tripsina; peptídeos com cargas 2+, 3+ e 4+; massa de peptídeo monoisotópica e tolerância de erro de massa de 0,1 Da, tanto para o íon precursor quanto para os íons fragmentados. As proteínas encontradas foram reportadas em ordem decrescente a partir do *score* calculado para cada uma das amostras. O nível de significância utilizado foi de $p=0,05$.

Para a identificação de proteínas, os arquivos .dat gerados pelo Mascot foram analisados pelo programa Scaffold Q+ (version Scaffold_4.6.1, Proteome Software Inc., Portland, OR), usado para validar a identificação de proteínas e peptídeos, realizando a busca nos mesmos bancos de dados utilizados inicialmente: Uniprot (Swissprot), Mycoclap e proteoma de *M. cinnamomea* CBS 343.55. Os seguintes parâmetros foram ajustados para as listas de proteínas identificadas com os três bancos de dados: probabilidade maior que 99,0% de identificação correta da proteína, contendo ao menos 2 peptídeos identificados para cada proteína e FDR até 1,0% para identificação de peptídeos. As probabilidades de identificação de proteínas foram calculadas pelo algoritmo *Peptide Prophet* (NESVIZHSKII et al., 2003) e a identificação de peptídeos foi realizada pelo algoritmo local Scaffold FDR. As proteínas que continham peptídeos similares e não puderam ser diferenciadas, baseando somente nos dados MS, foram agrupadas e não constam na listagem reportada neste trabalho.

4.7.4 Análise de dados dos secretomas

As proteínas identificadas foram analisadas por diversas ferramentas com interface de fácil uso para uma análise global do secretoma. Para predição de função, foram utilizadas as seguintes ferramentas: alinhamento local pela ferramenta *Protein BLAST* (Blastp) do NCBI¹⁵ contra o banco de dados de proteínas refseq_protein. Para a predição de função das CAZymes foi realizada busca através do *software* dbCAN¹⁶ (YIN et al., 2012); para a predição de função e análise do domínio conservado foi utilizada a ferramenta InterproScan¹⁷, utilizando *Gene Ontology* (*GO terms*). Para predição de localização, foram

¹⁵ Blastp - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

¹⁶ dbCAN - <http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/annotate.php>

¹⁷ InterproScan - <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>

utilizadas as seguintes ferramentas: predição de peptídeo sinal através SignalP v.4.1¹⁸; predição de proteína transmembrana TMHMM server v. 2.0¹⁹; predição de secreção da proteína por via não-clássica TatP 1.0 Server²⁰ (OLASON, 2005); predição da sub-localização de proteínas eucarióticas (animais e fungos) *ProtComp Version 9.0*²¹, com a opção de utilizar a anotação *Gene Ontology (GO terms)* (TSIRIGOS et al., 2015). Para obtenção de massa molecular e pI (ponto isoelétrico) da proteína madura (sem peptídeo sinal), foi utilizado ferramenta Expasy²².

4.8 Caracterização dos secretomas produzidos em condição de indução pelo substrato

Para estudar a cinética enzimática sobre diferentes substratos modelos e avaliar os níveis de atividade enzimática, foi realizada metodologia adaptada de Ribeiro et al. (2012). A mistura reacional continha as seguintes quantidades: 10 µL de secretoma (cerca de 5 µg de proteínas), 40 µL de tampão citrato (pH 4,8) 50mM e 50 µL de solução de cada substrato (polissacarídico ou sintético). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Uma unidade de açúcar redutor ou de *p*-nitrofenol (pNP) liberadas em µmol.ml⁻¹min⁻¹ foi considerada 1 U.mL⁻¹. Informações sobre os substratos modelos são encontradas no apêndice A do material suplementar.

As reações com os substratos polissacarídicos foram incubadas a 50 °C em tempos diferenciados, conforme o substrato: xilana (*birchwood*) e arabinoxilana (*wheat*) pelo tempo máximo de 20 minutos; xiloglucana (*tamarind seed*) tempo máximo de 60 minutos; arabinana (*sugar beet*), arabinana não-ramificada, β-glucana (*barley*), galactomanana (*carob*), galactomanana (*locust bean gum*) tempo máximo de 30 minutos. Os substratos polissacarídicos foram preparados na concentração 0,5% (p/p) em água destilada. Os açúcares redutores formados na reação foram dosados com 100 µL de DNS a partir de incubação a 95 °C por 5 minutos, pelo método de Miller (1959). A absorbância das amostras e dos controles foi lida a 540 nm em leitor de microplacas TECAN Infinity M200.

Os substratos sintéticos (*p*-nitrofenol-α-L-arabinofuranosídeo (*pNPA*), *p*-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (*pNPG*) e *p*-nitrofenol-β-D-xilopiranosídeo (*pNPX*)) foram preparados com concentração final de 4 mM em tampão citrato (pH 4,8) 50mM. A reação

¹⁸ SignalP - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

¹⁹ TMHMM - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

²⁰ TatP - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>

²¹ ProtComp - <http://www.softberry.com>

²² Expasy - http://web.expasy.org/compute_pi/

foi incubada a 50 °C em tempo máximo de 70 minutos. A quantidade de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberada foi revelada, ao parar a reação, com adição de 100 µL de bicarbonato de sódio 10% (p/v). A absorbância das amostras e dos controles foi lida a 410 nm em leitor de microplacas TECAN Infinity M200.

Para estudar os níveis de atividade de celulasas totais (papel de filtro – FPU) e de endoglucanases dos secretomas, foram utilizadas metodologias reportadas por Xiao, Storms e Tsang (2005) e Yu et al. (2016), respectivamente. A atividade de FPU do coquetel comercial Celluclast 1,5L (Sigma) também foi determinada pelo método de Yu et al. (2016) e o valor encontrado foi de 48 ± 2 FPU.ml⁻¹.

4.9 Ensaios de hidrólise enzimática

Para testar o potencial de hidrólise do secretoma produzido em condição de indução por polpa Kraft, foi proposto um ensaio de hidrólise para explorar a capacidade hidrolítica (hidrólise com polpa Kraft) e distintos ensaios para explorar a capacidade oxidativa (hidrólise com polpa de dissolução e Avicel) em contribuição ou não do coquetel comercial Celluclast 1.5 L (Sigma).

O ensaio de hidrólise em polpa Kraft foi realizado aplicando-se alta carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella* em uma cinética de hidrólise de 12, 24, 36 e 48 h. O ensaio contendo carga alta apresentou 50 mg de proteínas.g⁻¹ de celulose (1 mg de proteínas em 20 mg de substrato). A cada 12h, os tubos foram submetidos a centrifugação a 25000 x g por 5 min a 4 °C, colocados em banho de gelo por 3 minutos e alíquotas de 20 µL do sobrenadante foram removidas. Os tubos com o meio reacional foram agitados por inversão e devolvidos para incubação. As alíquotas retiradas foram diluídas até 400 µL (20X diluídas) e submetidas a dosagem dos açúcares liberados.

Os ensaios de hidrólise com polpa de dissolução e Avicel foram realizados em tempo total de 48 h de reação. Foram testados cenários de hidrólise apenas com secretoma de *M. pulchella* em baixa carga de proteínas, 5 mg proteínas.g⁻¹ de celulose (0,1 mg de proteínas em 20 mg de substrato), apenas com 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose e um cenário com 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose suplementado a baixa carga de proteínas (secretoma de *M. pulchella*), adicionado ou não de ácido ascórbico (1 mM). Foram realizados 12 cenários em triplicata conforme itens abaixo:

1 - Extrato baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella* na hidrólise com polpa de dissolução.

2 - Extrato baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, acrescido de ácido ascórbico, na hidrólise com polpa de dissolução.

3 - 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose na hidrólise com polpa de dissolução.

4 - 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose na hidrólise, acrescido de ácido ascórbico, na hidrólise com polpa de dissolução.

5 - 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose, suplementado com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, na hidrólise com polpa de dissolução.

6 - 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose, suplementado com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, acrescido de ácido ascórbico, na hidrólise com polpa de dissolução.

7 - Extrato baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella* na hidrólise com Avicel.

8 - Extrato baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, acrescido de ácido ascórbico (AA), na hidrólise com Avicel.

9 - 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose na hidrólise com Avicel.

10 - 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose, acrescido de ácido ascórbico (AA), na hidrólise com Avicel.

11 - 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose, suplementado com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, na hidrólise com Avicel.

12 - 10 FPU Celluclast 1,5L.g⁻¹ de celulose, suplementado com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, acrescido de ácido ascórbico (AA), na hidrólise com Avicel.

Ao final do ensaio de hidrólise realizada com polpa de dissolução e Avicel, os tubos foram fervidos a 95 °C por 10 minutos e submetidos a centrifugação a 25000 x g por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e uma diluição de 20X foi realizada para a dosagem de açúcares liberados.

As reações de hidrólise foram realizadas em tubos de microcentrífuga, com volume final de 1 mL em tampão citrato (pH 4,8) 50mM, contendo 0,01% (p/v) de azida sódica e consistência de 2% (m/v), exceto a reação com polpa Kraft que utilizou tampão fosfato (pH 7,0) 50mM. As reações foram incubadas a 50 °C, agitação de 120 rpm, pelo tempo máximo

de 48h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata com controles negativos e branco das misturas de enzimas.

Os teores de carboidratos foram determinados através de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pela metodologia de Ferraz et al. (2000). A concentração final de glucana e xilana foram obtidas através de curvas padrão de calibração com glicose e xilose. Os valores da conversão de glucana e xilana foram obtidos pela razão entre as massas secas finais e iniciais de glucana e xilana, em termos percentuais. Os teores de glucana e xilana presentes na polpa Kraft foram determinados neste trabalho, enquanto, para a polpa de dissolução, foi adotado teor padrão de 95% (m/m) de glucana segundo Andrade e Colodette (2014) e, para Avicel, foi adotado teor padrão de 97% (m/m) de glucana Qing e Wyman (2011). A análise estatística foi realizada com teste de ANOVA e Tukey, nível de significância de $p = 0,05$ foi adotado para diferenciar os cenários de hidrólise.

4.10 Análise da sequência intergênica (ITS)

4.10.1 Extração do DNA genômico

Para extração e obtenção do DNA genômico (DNAg) de *M. pulchella*, foram inoculados 10^7 esporos em 250 mL de meio MB contendo 1% de glicose (m/v), o pH foi ajustado para 7,0 e o cultivo incubado a 45 °C por 48 h com agitação de 120 rpm. Em um tubo livre de RNase e DNase, foram adicionadas cerca de 1,0 mg do micélio (peso úmido), juntamente com 500 µL de etanol 99%. O conteúdo foi misturado por inversão e foi realizada centrifugação a 1300 g por 3 minutos para retirada do etanol. Foram adicionadas 200 mg de pérolas de vidro estéreis e 600 µL solução de extração do kit *Wizard genomic DNA purification* (Promega). Esta metodologia foi adaptada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante, sendo incluída uma etapa de lavagem com solução clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Feita a lavagem, foi realizada centrifugação a 1600 g por 5 minutos e a fração aquosa foi recolhida. Novamente foi realizada a etapa de adição de 600 µL isopropanol até a obtenção do *pellet*, o qual foi seco em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em solução de reidratação do DNA (Promega) e incubado em banho a 65 °C por uma hora. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) para analisar a qualidade do DNAg extraído e também foi realizada dosagem de nucleotídeos em leitor Nanoquant (TECAN Infinity M200).

4.10.2 Amplificação, purificação e sequenciamento da sequência intergênica (ITS)

O DNAg extraído foi utilizado como amostra para a reação de PCR com os *primers* ITS5 e ITS4 para amplificação da região intergênica (ITS): *primer* ITS5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG (*forward*) e *primer* ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC (*reverse*) para selecionar a região não codificante de rDNA (entre as regiões 18S (SSU) - 5,8S - 28S (LSU)). As reações de PCR foram montadas em *master mix* de 300 µL (6X), utilizando a enzima *Phusion* DNA polimerase (*New England Biolabs*) conforme Tabela 2, variando a temperatura de anelamento entre 56 °C, 58 °C e 60 °C.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados nos ciclos e reações de PCR para amplificação da sequência ITS de *M. pulchella*.

Ciclos	Composição reação (1X)	
	Componentes	Quantidades (µL)
98 °C 30 s	DNAg	0,5
98 °C 10s, T anelamento* 30 s, 72 °C 25 s, 72 °C 2 min (35 ciclos)	<i>primer</i> ITS5	2
	<i>primer</i> ITS4	2
	dNTPs	2
	DMSO	2
	Mg ₂ Cl	0,5
	Enzima <i>Phusion</i>	0,5
	Tampão <i>Phusion</i>	10
15 °C ∞	Água milli Q	completado para 50 µL

*Temperatura de anelamento testada: 56 °C, 58 °C e 60 °C em duplicata.

Fonte: Arquivo próprio

Foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) para analisar a qualidade de amplificação da sequência ITS. O produto da reação de amplificação foi purificado com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*), segundo instruções do fabricante. Foi realizada dosagem de nucleotídeos em leitor *Nanoquant* (TECAN Infinity M200) para análise da concentração e pureza dos produtos de amplificação purificados. As amostras foram enviadas para o sequenciamento, etapa cuja realização foi executada em colaboração com a Dra. Juliana Velasco de Oliveira no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE – CNPEM, Campinas-SP), conforme protocolo interno.

Para análise do sequenciamento, a sequência de bases de nucleotídeos foi lida através do programa *Geneious* R9 v. 9.1.4²³ (KEARSE et al., 2012), através do qual foi realizada uma combinação entre as sequências *forward* e *reverse* do fragmento sequenciado (*assembly*) para obtenção de uma sequência consenso de melhor qualidade resolvida pelo alinhamento utilizando algoritmo do próprio programa. O resultado do sequenciamento das bases de nucleotídeos do fragmento ITS e qualidade dos cromatogramas das sequências *forward* e *reverse* encontram-se no material suplementar (apêndice E).

4.10.3 Análises comparativas da sequência ITS de *M. pulchella* com linhagens de *M. cinnamomea* e análise filogenética

Para a análise comparativa do ITS por semelhança, foram realizadas duas buscas pela ferramenta *Nucleotide BLAST* (Blastn) do NCBI²⁴ contra o banco de dados da coleção de nucleotídeos. A primeira busca foi realização com filtro de opção apenas pelas sequências depositadas para os organismos *M. cinnamomea* e *M. pulchella*. A segunda busca foi realizada contra todo o banco de dados da coleção de nucleotídeos do NCBI para validar os resultados da semelhança com *M. cinnamomea* e avaliar a semelhança com outras sequências depositadas. Para a construção da árvore filogenética, foram selecionadas 10 sequências de organismos do gênero *Malbranchea* sp. segundo as buscas realizadas pela ferramenta do NCBI e a linhagem *M. cinnamomea* IFM 41309 mencionada por Morgenstern et al (2012). Com essas sequências, foi realizado o alinhamento múltiplo pelo programa *ClustalX* v.2.0²⁵ (JEANMOUGIN et al., 1998; LARKIN et al., 2007). Foi utilizado output em formato FastA gerado pelo programa *ClustalX* e, para extrair as extremidades das sequências sem alinhamento, foi utilizado programa *Geneious* R9. As regiões extraídas foram realinhadas em modo global na opção de múltiplas sequências, *MUSCLE Alignment* e *Matrix* 65% de similaridade. Para construção da árvore filogenética, foi utilizado a ferramenta *Geneious tree builder*, com a opção de usar a distância entre espécies segundo o alinhamento. Os seguintes parâmetros foram utilizados para construção da árvore: *Genetic distance model*: Tamura-Nei, método estatístico para construção da árvore em *Neighbor-joining* (sem grupo externo); Teste de filogenia *Bootstrap*; número de replicações igual a 100; modelos aleatórios em 988,295 e limite de suporte de 50%.

²³ Geneious - <http://www.geneious.com>

²⁴ Blastn - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

²⁵ Clustal X2 - <http://www.clustal.org/clustal2/>

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise das condições de crescimento

O conceito de secretoma adotado, neste trabalho, refere-se ao conjunto de proteínas produzidas e enviadas para o meio extracelular (exosecretoma), como uma resposta do mecanismo molecular ao estado metabólico do microrganismo, o qual pode variar segundo a espécie, as condições ambientais e nutricionais (MADAN; THIND, 1998). Entender os estados de crescimento e desenvolvimento segundo os parâmetros ambientais (temperatura e pH) e disponibilidade de nutrientes são importantes, pois repercutem diretamente na produção de proteínas e metabólitos.

Com o objetivo do trabalho de analisar o secretoma do fungo *M. pulchella*, foi necessário determinar as condições ótimas para seu crescimento, devido a pouca informação existente na literatura sobre este o fungo. Foram avaliados os efeitos causados por parâmetros como temperatura, pH e fonte de carbono no crescimento do fungo a partir de medidas indiretas. Além disso, foram levantados dados sobre linhagens sinônimas e linhagens bem caracterizadas para demonstrar os efeitos semelhantes e comportamentos distintos frente aos parâmetros.

Em se tratando de um fungo filamentosos, para estimar seu crescimento, foram utilizadas medições do diâmetro da colônia (micélio) em ágar ao longo do tempo para acompanhar o seu desenvolvimento. O princípio desta técnica está baseado no fato de que o crescimento das hifas acontece essencialmente em suas pontas (apical), sendo que segmentos já formados não continuam alongando (SMITH, 1924). Assim, é possível encontrar uma razão linear, considerando apenas o aumento radial da colônia em um menor tempo de medição, uma vez que o crescimento é constante. O alongamento radial do micélio pode ser utilizado como uma medida indireta do crescimento específico do fungo para a maioria dos casos desde que o incremento do aumento radial das hifas não varie com os parâmetros de incubação. Foi observado que a correlação entre o crescimento radial e o crescimento específico não acontece entre cultivos que testem a variação de concentração de nutrientes e na comparação entre espécies (TRINCI, 1971).

5.1.1 Efeito da temperatura

O estudo do efeito da temperatura no crescimento dos fungos é relevante para caracterizar a temperatura ótima de cultivo da linhagem em estudo. Além disso, conhecer a capacidade de crescimento do fungo frente a variação de temperatura permite reconhecer estados de crescimento *versus* estados de sobrevivência, já que a temperatura é um fator que afeta praticamente todas as funções de um organismo. Por ter importante papel no crescimento, a temperatura também influencia em outras etapas do desenvolvimento dos organismos, como o caso da esporulação nos fungos (MADAN; THIND, 1998).

Para avaliar a resposta de crescimento do fungo *M. pulchella* em diferentes temperaturas e classificá-lo segundo sua termotolerância, foi feita a avaliação do aumento do diâmetro das colônias em função do tempo de cultivo nas seguintes temperaturas de incubação: 27 °C, 37 °C, 45 °C e 55 °C, em meio MB-ágar, pH 7,0, acrescido de glicose. As temperaturas de incubação testadas, foram escolhidas por constituir limites em que é possível a classificação de microrganismos em termotolerantes ou termofílicos, segundo classificações adotadas (JOHRI; SATYANARAYANA; OLSEN, 1999; MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000).

Os dados da Figura 3A mostram a taxa média diária de crescimento do diâmetro ao longo do período de cultivo de 14 dias. Foi possível observar que, nas temperaturas de 37 °C e 45 °C, a taxa média de crescimento das colônias foi constante entre o 2° e o 9° dia de cultivo, indicando uma região linear de crescimento. Após 9 dias, a taxa média reduziu gradativamente, devido à diminuição da velocidade de crescimento das colônias. Já na temperatura de 55 °C, foi possível observar que a taxa média de crescimento permaneceu constante por um menor tempo, entre o 2° e o 4° dia, e, para a temperatura de 27 °C, apenas foi observada germinação das colônias a partir do 5° dia de cultivo. Após este período, a taxa de crescimento do fungo a 27 °C permaneceu constante, sendo as menores médias avaliadas. Os períodos onde houveram taxas de crescimento constante, foram utilizados para a obtenção de modelos lineares de crescimento. Utilizando o período total de 7 dias de cultivo, foram obtidas as velocidades de crescimento linear e os respectivos modelos lineares (Figura 3B). Por meio da avaliação da velocidade de crescimento linear *versus* a respectiva temperatura de incubação, foi demonstrado o efeito da temperatura no crescimento de *M. pulchella* e foi obtida uma curva de temperatura com ajuste de tendência polinomial com boa correlação (Figura 3C).

Figura 3 - (A) Taxa média de crescimento do fungo *M. pulchella* cultivado nas temperaturas de 27 °C, 37 °C, 45 °C e 55 °C com relação ao tempo de cultivo. **(B)** Acompanhamento do crescimento do diâmetro do micélio nas temperaturas avaliadas pelo período de 7 dias e seus respectivos modelos lineares. **(C)** Efeito da temperatura no crescimento de colônia do fungo *M. pulchella* em meio MB-ágar acrescido de glicose e pH 7,0.

Os modelos lineares gerados para cada temperatura estão ao lado da respectiva temperatura na legenda.

Fonte de carbono: Glicose

Fonte: Arquivo próprio

Os dados da Figura 3B mostram que *M. pulchella* apresenta crescimento com velocidade mais elevada a 45 °C quando comparadas a temperaturas como 27 °C e 55 °C, que apresentaram velocidades menores. As temperaturas mínima, ótima e máxima de crescimento para *M. pulchella* foram respectivamente 27 °C, 45 °C e 55 °C. Esses resultados corroboram com as temperaturas de crescimento reportadas para *M. cinnamomea*: 25 °C, 45 °C e 57 °C, respectivamente (JOHRI; SATYANARAYANA; OLSEN, 1999; MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000). Sugere-se através do acompanhamento realizado, que *M. pulchella* trata-se de uma espécie termofílica, já que suas características

de crescimento se encaixam nas classificações de espécies que não se desenvolvem em temperaturas abaixo de 20 °C, mas podem crescer a 45 ou 50 °C, o que segundo a classificação, sugere ser um fungo termofílico.

Um aspecto importante sobre a velocidade de alongamento radial de *M. pulchella* é que este ascomiceto apresenta crescimento lento quando comparado com outros do mesmo filo, como os termofílicos *Thielavia terrestris* e *Myceliophthora thermophila* (MORGENSTERN et al., 2012). A característica de crescimento lento também foi reportada por Morgenstern et al. (2012), que observou a cobertura total da placa de Petri pelo micélio do fungo *M. cinnamomea* em 11 dias, quando cultivado em meio contendo *mycobroth*-ágar a 45 °C e pH 5,5. Neste trabalho, foi observado o tempo total para que *M. pulchella* ocupasse toda a área da placa de Petri contendo meio MB-ágar acrescido de glicose (extensão da placa: 8 cm). Na temperatura de 45 °C, foram necessários cerca de 14 dias e a 37 °C foram necessários cerca de 16 dias (dados não mostrados). Já nas temperaturas de 27 °C e 55 °C, devido a baixa velocidade de crescimento ou ao crescimento ausente em algumas replicatas, não foi possível observar a cobertura total da placa pelo micélio do fungo durante o período máximo observado de 18 dias (dados não mostrados). Outro aspecto que confirma o crescimento lento, foi a germinação das colônias do fungo que começou após o 2º dia de cultivo, dando início a uma fase linear de crescimento nas temperaturas de 37 °C, 45 °C e 55 °C. Esse período de adaptação foi identificado como sendo a fase *lag* de crescimento do fungo em estudo.

Com o objetivo de comparar o efeito da temperatura e termotolerância de *M. pulchella* frente a outras espécies já caracterizadas, foi realizado o acompanhamento do crescimento das colônias do fungo em estudo, comparando-as com o crescimento de *Aspergillus fumigatus*, fungo termotolerante que apresenta crescimento ótimo em cerca de 37 °C e pode sobreviver em temperaturas de até 50 °C e com o crescimento de *Trichoderma reesei*, fungo mesofílico modelo (JOHRI; SATYANARAYANA; OLSEN, 1999; SINGH et al., 2016). A comparação foi realizada através de medições do diâmetro das colônias em cada temperatura de incubação em função do tempo de cultivo em meio PDA. As médias de crescimento radial para cada espécie testada estão representadas na Figura 4. Foi possível demonstrar uma maior tendência de crescimento do fungo *M. pulchella* a temperaturas mais altas em detrimento a *A. fumigatus* e *T. reesei*, confirmando mais uma vez a classificação da linhagem em estudo como termofílica.

Figura 4 - Taxa média de crescimento dos fungos *A. fumigatus*, *M. pulchella* e *T. reesei* em meio PDA incubados nas temperaturas de 27 °C, 37 °C, 45 °C e 55 °C para avaliação do efeito da temperatura.

Fonte de carbono: PDA
Fonte: Arquivo próprio

A Figura 5 mostra o aspecto visual dos micélios, considerando a triplicata biológica de cada temperatura de incubação no acompanhamento do crescimento através dos diâmetros das colônias. Foi possível observar um aspecto mais liso e com maior coloração nos micélios nas placas incubadas a 37 °C. Essa coloração provém principalmente dos esporos amarelos de *M. pulchella*, cuja maior esporulação foi observada quando cultivado a 37 °C se comparada a temperatura de 45 °C, indicando que a temperatura ótima de esporulação é 37 °C. Os autores Madan e Thind (1998) citam o trabalho de Cochrane (1958) que a temperatura de esporulação e a ótima de crescimento são muito próximas, e acrescentam que cada tipo de esporo possui sua própria temperatura ótima, podendo não coincidir com a temperatura de crescimento vegetativo. Este aspecto foi observado na Figura 5, uma vez que a 45 °C, temperatura ótima de crescimento, existe a predominância de hifas vegetativas e aéreas e apresentam coloração levemente amarelada e marrom.

Figura 5 - Avaliação das características visuais das colônias do fungo *M. pulchella* quando submetidas a diferentes temperaturas.

Fonte: Arquivo próprio

De acordo com os autores Johri, Satyanarayana e Olsen (2013), as linhagens sinônimas do fungo *M. cinnamomea* apresentam hifas de coloração amarela em variações de marrom, além de apresentar artroconídeos cilíndricos amarelos, castanho e amarelo-esverdeado. Essa mesma coloração foi observada tanto nas hifas (Figura 5) quanto nos esporos de *M. pulchella*, quando contado em câmara de Neubauer.

Um aspecto a ser enfatizado nos cultivos com temperaturas de incubação mais elevadas é a necessidade do controle da umidade. Esse fator foi essencial para reduzir os desvios experimentais na avaliação de crescimento e, em geral, para trabalhar com temperaturas de 45 °C ou acima, prevenindo o ressecamento do meio de cultivo.

5.1.2 Efeito do pH

O efeito do pH é um aspecto importante a ser determinado para avaliar o crescimento, pois afeta os mecanismos enzimáticos e, por consequência, o *status* nutricional dos organismos. Alterações no pH modificam a absorção dos nutrientes, a solubilidade dos íons e a dissociação de moléculas, assim determinando a disponibilidade de nutrientes para serem consumidos (MADAN; THIND, 1998). Os fungos termofílicos são tolerantes a variações do pH e a maioria das espécies podem crescer na faixa de pH entre 4,0 e 8,0 (SINGH et al., 2016).

Para a avaliação do pH ótimo de crescimento de *M. pulchella* foi realizado um acompanhamento preliminar do aumento dos diâmetros das colônias do fungo *versus* o tempo de cultivo, variando o pH na faixa de 4,0 a 8,0 a 37 °C em meio MB-ágar acrescido de glicose. A avaliação da taxa média de crescimento no período de 7 dias mostrou que *M. pulchella* é capaz de crescer em pH entre 4,0 e 8,0 e possui velocidade de crescimento mais baixa quando incubado em pH 4,0, enquanto as velocidades de crescimento na faixa de pH entre 5,0 e 8,0 apresentam-se similares (dados não mostrados para pH 4,0 e 5,0). Para comparar o efeito do pH nas temperaturas de incubação 37 °C e 45 °C, foi escolhida a faixa de pH entre 6,0 e 7,5 para acompanhamento do diâmetro de colônia ao longo de 7 dias de cultivo. A Figura 6 mostra os resultados desse acompanhamento diário (Figuras 6A e 6B) e também em termos de taxa média de crescimento (Figuras 6C e 6D).

Figura 6 - Acompanhamento do crescimento de *M. pulchella* através da medição do diâmetro das colônias com pH na faixa de 6,0 a 7,5 em meio MB-ágar acrescido de glicose incubados nas temperaturas de 37 °C e 45 °C durante 7 dias de cultivo.

A e C: temperatura de incubação 37 °C

B e D: temperatura de incubação 45 °C

Os modelos lineares gerados para cada pH estão mostrados em ordem crescente de pH (6,0-7,5) para cada temperatura de incubação na Figura A e B.

Fonte: Arquivo próprio

O fungo *M. pulchella* apresentou velocidade de crescimento muito semelhante entre os pHs testados (entre 6,0 e 7,5), para ambas temperaturas de incubação, 37 °C e 45 °C (Figuras 4A e 4B). Isto é evidenciado pelo fato da taxa média de crescimento diário ser constante para os cultivos testados no período de 7 dias (Figuras 4C e 4D). Esse resultado mostra que o fungo em estudo é tolerante a modificações nesta faixa de pH quando cultivado em meio MB-ágar acrescido de glicose. Foi reportado pelo autor Rosenberg (1975) o pH

ótimo de 7,1 para do fungo *M. pulchella* var. *sulfurea* por cultivado por 5 dias em meio mínimo suplementado de extrato de levedura e glicose. Entretanto, a fase de crescimento linear para as condições testadas com *M. pulchella* permitiram um crescimento superior se comparada a linhagem estudada por Rosenberg (1975), sendo que esta atingiu um diâmetro de aproximadamente 2,00 cm e *M. pulchella* de 4,00 cm.

A Figura 7 mostra o aspecto visual dos micélios durante o acompanhamento do diâmetro de crescimento quando o fungo foi incubado em diferentes pHs. Nota-se que, apesar da mudança de pH entre 6,0 a 7,5 não apresentar um efeito pronunciado em relação ao crescimento, foi evidenciado um efeito em relação à produção de esporos, ao desenvolvimento de hifas aéreas e a mudança de coloração dos micélios. Esses aspectos parecem ser mais marcantes em pH 7,5 e menos marcantes em pH 6,0 tanto a 37 °C quanto a 45 °C.

Figura 7 - Avaliação das características visuais das colônias do fungo *M. pulchella* quando cultivado em meio MB-ágar acrescido de glicose com variação de pH na faixa de 6,0 a 7,5 incubados nas temperaturas de 37°C e 45°C durante 7 dias de cultivo.

Fonte: Arquivo próprio.

5.1.3 Efeito da fonte de carbono

A avaliação da capacidade de crescimento utilizando diferentes fontes de carbono é interessante do ponto de vista nutricional, pois é possível obter indícios da capacidade do fungo em utilizar diferentes substratos, além de poder fazer inferências sobre o arsenal enzimático produzido. Inicialmente, realizou-se um acompanhamento do crescimento do diâmetro das colônias ao longo do tempo de cultivo, quando o fungo *M. pulchella* foi

incubado em meio MB-ágar acrescido de avicel, carboximetilcelulose (CMC), xilana e xilose. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas medidas dos diâmetros das colônias entre as fontes de carbono testadas (dados não mostrados). Realizou-se também a avaliação do efeito da fonte de carbono de maneira qualitativa, apenas em relação à capacidade de germinação do fungo *M. pulchella* em relação a velocidade de crescimento, como realizado anteriormente para o efeito da temperatura e do pH.

Existe uma limitação da técnica utilizada para avaliar o crescimento linear através da medição do diâmetro das colônias em fungos filamentosos. Esta limitação está relacionada a não existência de uma correlação obrigatória entre o crescimento radial (taxa de crescimento relativo) e a massa de fungo produzida (crescimento específico). O motivo para isso é devido ao desenvolvimento radial considerar apenas um eixo de crescimento e não o volume, o qual é caracterizado também pela emissão de hifas aéreas. De acordo com Madan e Thind (1998) o aumento linear do micélio de um fungo filamentoso ao longo do tempo em meio sólido, quando comparado entre meios com composição diferente, por exemplo, um meio completo e outro com ausência de algum nutriente, podem ou não diferir em termos de alongamento das hifas durante o espalhamento do micélio (MORRISON; RIGHELATO, 1974; TRINCI, 1971). Entretanto, diferem na densidade do micélio como mostraram Pirt (1973) e Shrestha et al. (2006).

A Figura 8 mostra o resultado da germinação e o aspecto dos micélios produzidos por *M. pulchella* cultivado por 5 dias em meio MB-ágar suplementado com diferentes fontes de carbono a 45 °C e pH 7,0. O resultado obtido pelo monitoramento após inóculo do fungo nas 18 fontes de carbono em concentração de 0,5% (p/v) mostra que houve germinação e crescimento do micélio em todas as condições testadas (Figura 8A). O resultado é um indicativo de que o fungo apresenta potencial para crescimento em diferentes substratos, inclusive, em substratos que mimetizam frações dos materiais lignocelulósicos e em substratos complexos como em polpa Kraft e eucalipto moído. A validação do resultado foi confirmada a partir da comparação do crescimento entre dois controles: MB-ágar sem fonte de carbono (Figura 8B, substrato nº 1) e MB-ágar sem fonte de carbono e sem fonte de nitrogênio (sem triptona) (Figura 8B, substrato nº 2). No primeiro controle, grande parte do micélio observado é aéreo e, praticamente, não houve esporulação. Já no segundo controle, o crescimento foi bastante inferior aos demais testes.

Figura 8 - Validação do crescimento de *M. pulchella* incubado por 5 dias à 45 °C em diferentes fontes de carbono.

A: Numeração indicativa das fontes únicas de carbono na concentração 0,5% (p/v) utilizadas em suplementação no MB-ágar: 1- Goma de *locust bean*, 2- CMC, 3- Glicose, 4- Quitosana, 5- Liqueenana, 6- Arabinosilana, 7- β -glucana, 8- Arabinana sem ramificação, 9- Xilana lariço (*larch wood*), 10- Xiloglucana, 11- Arabinana de beterraba (*sugar beet*), 12- Galactomanana, 13- Xilana *beech wood*, 14- Avicel, 15- Polpa de celulose, 16- Eucalipto, 17- Ácido poligalactourônico, 18- Arabinogalactana lariço (*larch*).

B: Numeração indicativa dos controles: 1- sem fonte de carbono, 2- sem fonte de carbono e sem de nitrogênio (triptona)

Fonte: Arquivo próprio.

Em relação ao aspecto visual das colônias resultantes do teste de crescimento em diferentes fontes de carbono (Figura 8A), foi possível observar de forma comparativa as diferentes densidades de cada micélio e a existência ou não de pigmentação. O meio contendo glicose (Figura 8, substrato nº 3) apresentou o micélio mais espesso dentre as fontes de carbono testadas, além de possuir coloração levemente amarelada. Os substratos de número 6, 9 e 12, arabinosilana, xilana de lariço e galactomanana, respectivamente, foram as fontes de carbono que apresentaram micélios aparentemente menos densos. Apesar de não haver escurecimento expressivo do ágar em nenhum dos meios testados, observou-se que próximo ao micélio houve a produção de uma pigmentação mais escura, próximo ao vermelho, além do próprio micélio apresentar tons de amarelo. O meio em que foi observada a maior produção de pigmentos foi em presença de β -glucana (Figura 8, substrato nº 7),

sendo que uma característica desse substrato é a ramificação da cadeia com a presença de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e β -1,6.

Os autores Johri, Satyanarayana e Olsen (1999) citaram que linhagens de *M. cinnamomea* têm a característica de produzir pigmentos que escurecem o meio de cultura colonizado. Segundo esses autores, algumas espécies de fungos termofílicos, como *M. pulchella* var. *sulfurea*, também apresentam produção de pigmentos nas colorações de amarelo até vermelho e essa produção pode variar consideravelmente de acordo com a temperatura de crescimento, idade do cultivo e tipo de substrato utilizado. Além disso, em uma análise de infra-vermelho, os autores descreveram os pigmentos produzidos sendo de natureza polifenólica, formada por quinonas policíclicas hidroxiladas. Entretanto, apesar da produção de uma coloração mais escura no meios semi-sólidos, neste trabalho, não foi avaliado se *M. pulchella* também produz os mesmos compostos químicos como pigmentos.

5.2 Biodegradação

Uma maneira de determinar se o fungo é capaz de consumir polissacarídeos mais complexos e avaliar qual o tipo de degradação em material lignocelulósico é através do estudo da biodegradação *in vitro*. Pela avaliação da extensão de degradação dos polissacarídeos presentes na parede celular de materiais lignocelulósicos e, posterior, análise da perda de componentes, é possível avaliar a estratégia do fungo para despolimerizar o material lignocelulósico. Para isso, a biodegradação foi testada com o eucalipto moído para observar o comportamento de degradação de um material lignificado e a polpa Kraft foi escolhida como um material “não-lignificado” (pouco lignificado).

O conceito de perda de massa adotado foi o consumo do substrato até sua mineralização, a qual acontece após o processo de despolimerização do material por meio das enzimas lignocelulolíticas, gerando frações oligoméricas de seus componentes. Essas frações são transformadas em produtos solúveis e, posteriormente, são convertidos pelo fungo em dióxido de carbono e água, levando à mineralização do substrato (KIRK; CULLEN, 1998). O material resultante após a biodegradação foi chamado de resíduo sólido insolúvel ou material biodegradado. A partir da razão entre a massa de substrato final no período avaliado e a massa inicial, obtém-se o Rendimento de Sólidos Insolúveis (RSI), que representa o percentual em massa do substrato não mineralizado pelo fungo. Foi realizado um controle abiótico, nas mesmas condições de cultivo (sem o fungo), até o 21º dia de

acompanhamento as perdas de massa foram baixas, sendo 2% (p/p) para a polpa Kraft e 3% (p/p) para o eucalipto moído e lavado com etanol 98%, dados disponíveis no material suplementar (apêndice B). Devido à baixa perda de massa e de teor dos polissacarídeos apresentados nos controles abióticos, os substratos controle utilizados como referência para os cálculos de perda de massa e perda de componentes foram os materiais *in natura*.

Os dados mostrados nas Tabelas 3 e 4 resumem em termos numéricos a extensão de degradação causada por *M. pulchella* após seu cultivo em polpa Kraft e em eucalipto moído durante o período entre 7 e 21 dias, posteriormente, estendido até 60 dias. Nos cultivos semi-sólidos utilizados para a biodegradação, a consistência de sólidos foi de 14,3% (p/v) e as biomassas “não-lignificada” e lignificada foram as únicas fontes de carbono presentes nos respectivos cultivos. As Tabelas 1 e 2 mostram a composição química da polpa Kraft e do eucalipto moído *in natura* (não biodegradados), as composições químicas dos materiais resultantes após a biodegradação causada por *M. pulchella*, assim como o rendimento percentual em massa RSI. Através da composição química de cada material e do rendimento, foi possível calcular o balanço de massa dos componentes presentes no resíduo sólido após cada período de biodegradação.

O teor de extrativos não foi apresentado nas tabelas de composição química e não foi considerado para os cálculos dos demais teores, com exceção do eucalipto moído *in natura*, o qual apresentou teor de extrativos médio de 3,28% (p/p) que foi utilizado para reajustar os demais teores de lignina, glucana e xilana deste material. O teor de extrativos não foi considerado para os materiais biodegradados, pois, para submeter o eucalipto moído à avaliação de biodegradação *in vitro*, o material foi lavado sucessivamente com etanol 98% (v/v), executando o procedimento de remoção dos extrativos para toda biomassa utilizada na pesquisa. Onde se lê o uso do eucalipto como biomassa para cultivo, entende-se eucalipto moído e lavado. Os autores Abbas et al. (2005) demonstraram para madeira de carvalho (*red oak*), que a retirada dos extrativos melhora a resolução de técnicas posteriores, como a eletroforese SDS-PAGE para o estudo da proteômica. Desde então, foi adaptado a utilização de eucalipto moído e sem os extrativos. Além disso, não foi detectado presença de extrativos na polpa Kraft *in natura*, e, por isso, os teores de extrativos obtidos após biodegradação foram desconsiderados também para os resíduos sólidos insolúveis obtidos dos cultivos com polpa Kraft. Apesar de o teor de extrativos não ter sido considerado no cálculo, todos os materiais biodegradados foram submetidos a uma lavagem com água, para retirar o micélio do fungo aderido ao material e, posteriormente, submetidos a lavagens sucessivas com etanol

Tabela 3 - Composição química, Rendimento de Sólidos Insolúveis (RSI) e balanço de massa dos componentes da Polpa Kraft não tratada e biodegradada por *M. pulchella* durante o período entre 7 e 60 dias.

Amostras	Teor dos Componentes (g/100 g de biomassa analisada)			RSI	Balanço de massa dos componentes (g/100 g de biomassa original)		
	Lignina	Glucana	Xilana	% (p/p)	Lignina	Glucana	Xilana
Polpa Kraft							
Não biodegrada	1,5 ± 0,2	76 ± 1	13,9 ± 0,1	100	1,5	76	13,9
Material biodegradado por <i>M. pulchella</i>							
7 dias	1,9 ± 0,4	78,5 ± 0,8	12,4 ± 0,3	87,9	1,7	69,0	10,9
14 dias	4,4 ± 0,7	79,7 ± 0,8	9,2 ± 0,1	85,0	3,7	67,7	7,8
21 dias	4,7 ± 0,9	79 ± 1	8,91 ± 0,04	81,0	3,8	64	7,2
60 dias	5,8 ± 0,1	74 ± 2	7,9 ± 0,4	48,1	2,8	35	3,8

Tabela 4 - Composição química, Rendimento de Sólidos Insolúveis (RSI) e balanço de massa dos componentes do Eucalipto moído e biodegradado por *M. pulchella* durante o período entre 7 e 60 dias.

Amostras	Teor dos Componentes (g/100 g de biomassa analisada)			RSI	Balanço de massa dos componentes (g/100 g de biomassa original)		
	Lignina	Glucana	Xilana	% (p/p)	Lignina	Glucana	Xilana
Eucalipto moído							
Não biodegradado	28,3 ± 0,1*	45,3 ± 0,2*	12,9 ± 0,1*	100	28,3	45,3	12,9
Material biodegradado por <i>M. pulchella</i>							
7 dias	27,2 ± 0,3	45,9 ± 0,3	12,8 ± 0,1	97,0	26,4	44,5	12,4
14 dias	27,3 ± 0,2	45 ± 1	12,8 ± 0,2	95,7	26,1	43	12,2
21 dias	29,2 ± 0,2	46,2 ± 0,2	13,1 ± 0,3	94,8	27,7	43,8	12,4
60 dias	28,5 ± 0,5	41 ± 2	11,7 ± 0,7	96,7	27,6	40	11,3

*Valores finais após retirar teor de extrativos, demais valores não consideraram o teor de extrativos. Fonte: Arquivo próprio.

95%, que ajudou a eliminar produtos solúveis, entre outros produtos de degradação que pudessem estar aderidos ao resíduo sólido insolúvel.

Os resultados do balanço de massa apresentados nas Tabelas 3 e 4 mostram um menor rendimento de sólidos insolúveis, conseqüentemente, uma maior perda de massa durante a biodegradação de polpa Kraft, contando com um RSI de 48,1% (p/p) e 51,9% (p/p) de perda de massa em 60 dias de biodegradação, em detrimento ao RSI de 96,7% (p/p) e apenas 3,3% (p/p) em perda de massa obtida na biodegradação do eucalipto no mesmo período. Esse resultado de maior degradação da polpa Kraft já era esperado devido à ausência da matriz recalcitrante e barreira física proporcionada pela lignina, já que os polissacarídeos desse material estão mais acessíveis às enzimas hidrolíticas, enquanto no eucalipto não tratado a presença de alto teor de lignina e poucos poros no material impedem a atuação das enzimas hidrolíticas. Esse resultado mostra que o fungo *M. pulchella* não apresenta grande capacidade de degradação de materiais lignocelulósicos sem pré-tratamento.

Os resultados de biodegradação da polpa Kraft (Tabela 3) mostram que houve uma preferência de degradação de polioses, com ênfase em uma maior degradação de xilana. Uma justificativa para esse fenômeno pode ser devido a existência de xilana depositada nas fibras de celulose, a recalcitrância intrínseca do empacotamento das fibras de celulose e a alta capacidade hidrolítica das xilanases de *M. pulchella*. Os autores Ribeiro et al. (2014b) reportaram a clonagem, expressão heteróloga e a caracterização de uma xilanase da família GH10 produzida por *M. pulchella*, a qual demonstrou alta capacidade de hidrólise de xilana de bagaço explodido.

Em relação a quantidade de lignina presente em polpa, apresentada na Tabela 3, foi observado que não houve perda de teor ao longo do período de 60 dias de cultivo, sendo que a lignina presente no material inicial ficou acumulada nos todos os resíduos sólidos insolúveis avaliados. Pelo balanço de massa, parece ter havido um aumento aparente de lignina ao longo do período. Os teores que contribuíram para esse “incremento” no valor de lignina total foi o aumento da quantidade de lignina Klason. Apenas no material biodegradado por 60 dias foi detectado um aumento no teor de lignina solúvel, dados disponíveis no material suplementar (apêndice B). É provável, portanto, que esse aumento relativo no teor de lignina total possa ser resultante de um erro de procedimento de determinação de lignina Klason durante o período de secagem do material.

Com relação a biodegradação do eucalipto, os resultados mostraram uma baixa perda de massa e pouca redução nos teores dos componentes (Tabela 4). A extensão do período de biodegradação até 60 dias foi proposta para certificar a degradação em períodos maiores de exposição a *M. pulchella*, entretanto não houve maior mineralização do material. Apesar disso, foi possível visualizar crescimento de micélio do fungo desde o período mais curto de biodegradação (7 dias) até o período de 21 dias, o qual permaneceu na superfície úmida do material. Já nos cultivos de 60 dias, a dificuldade em manter a umidade do meio a 45 °C foi um dos prováveis fatores que dificultaram o desenvolvimento do fungo, sendo que a colonização permaneceu apenas superficial em todo o período.

O conceito de perda do teor de componentes foi adotado como a diferença entre o teor inicial e final dos principais componentes do material, lignina, celulose (glucana), hemicelulose (xilana), obtidos a partir do balanço de massa, quando comparados com os teores do material *in natura* (material inicial, não biotratado) em termos percentuais. A Figura 7 mostra o perfil de evolução percentual da perda de massa e do teor de polissacarídeos, glucana (celulose) e xilana (hemicelulose), ao longo do período de biodegradação de polpa Kraft (Figura 9A) e eucalipto (Figura 9B).

Os dados mostrados na Figura 9 resumem a tendência de degradação de *M. pulchella*, mostrando que, em substrato pouco lignificado, a perda de massa inicial é relativa à remoção de xilana. A Figura 9A mostra que, após o consumo de aproximadamente 50% (p/p) da xilana presente no material, a perda de glucana se tornou mais expressiva, resultando em perda de aproximadamente 54% (p/p) em 60 dias de biodegradação. Devido à glucana ser o componente em maior teor na polpa Kraft, notou-se que o perfil de perda de massa acompanha o perfil de perda do teor de glucana ao longo de todo o período de avaliação (Figura 9A). Já, no cultivo em eucalipto (Figura 9B), uma perda de massa drasticamente menor é mostrada e não aponta para o consumo progressivo dos componentes. Durante o período de avaliação no cultivo com eucalipto, a maior perda de massa identificada foi em 21 dias de biodegradação, atingindo cerca de 5% (p/p). Ao final de 60 dias de biodegradação, os teores de glucana e xilana mostraram ambos uma perda de massa de cerca de 10% (p/p). O motivo pelo qual essa diminuição de teor não refletiu em um aumento na perda de massa do material foi devido ao fato de que a celulose possivelmente tenha sido despolimerizada, mas as frações resultantes não chegaram a ser mineralizadas.

Figura 9 - Evolução percentual da perda de massa e perda em massa no teor de componentes dos substratos polpa Kraft (A) e eucalipto moído e lavado (B).

Fonte: Arquivo próprio.

Como mostrado na Figura 9B, não foi possível observar um padrão de degradação de madeira durante o período de 60 dias. O motivo identificado para esse comportamento de baixa degradação e despolimerização obtido na biodegradação do eucalipto, comparativamente com o padrão de polpa Kraft, é que a maquinaria de degradação do fungo em estudo é baseada essencialmente em mecanismos hidrolíticos e que o fungo não possui maquinário eficiente para contornar a recalcitrância do eucalipto e/ou é ausente de enzimas lignolíticas para degradar material lignocelulolítico intacto (sem pré-tratamento). Esse resultado de biodegradação é uma contraposição ao que os autores Jain et al (1979) reportaram para a linhagem *M. pulchella* var. *sulfurea*, a qual foi capaz de crescer e degradar palha de trigo alcançando uma perda de massa de 17% (p/p) em um cultivo semi-sólido após 15 dias, degradando tanto celulose quanto lignina.

Em relação à produção de enzimas lignolíticas, até o presente momento, existem evidências de que o fungo *M. pulchella* não apresenta atividade de lacase (RIBEIRO et al, 2014a). Entretanto, uma busca realizada no genoma de *M. cinnamomea*, disponibilizado pelo grupo Genozymes, mostrou que este fungo possui 4 genes que codificam lacases pertencentes a família AA1, 2 genes que codificam peroxidases da família AA2 e 6 genes que codificam oxidases da família AA3, maquinaria que, se super-expressa, poderia ser eficiente na degradação de lignina. Todavia, como houve baixa degradação da lignina e de polissacarídeos no material lignificado, sugerimos que o fungo *M. pulchella* em estudo provavelmente possui uma degradação do tipo branda, a qual é descrita para muitos

ascomicetos (ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990). Apesar de, em alguns casos, o padrão degradação branda ser semelhante ao padrão de degradação parda, os autores Eriksson, Blanchette e Ander (1990) mostram que, para alguns ascomicetos, só é possível observar degradação dos componentes do eucalipto em 12 semanas de cultivo.

5.2.1 Avaliação de imagem dos materiais biodegradados

A presença de lignina constitui uma barreira física ao ataque por microorganismos. Entender se o fungo em estudo é capaz de modificar a lignina presente em materiais lignocelulósicos é uma forma de avaliar o potencial enzimático oxidativo presente em sua maquinaria celular, além de contribuir no entendimento de seu modo de ação e no tipo de degradação realizada. Para avaliar se *M. pulchella* causou alguma modificação na lignina do eucalipto, foram utilizadas as técnicas de microespectroscopia-UV e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A microespectroscopia-UV foi utilizada para avaliar a quantidade de lignina presente na parede celular secundária das sondas expostas aos cultivos de biodegradação. A Figura 10A mostra a média de cerca de 40 espectros capturados de diferentes paredes secundárias das células vegetais nas lâminas cortadas das sondas controle e dos materiais biodegradados por 7, 14 e 21 dias. O principal aspecto a ser avaliado nesta figura são comprimentos de onda na região UV relativos a absorção de estruturas que apresentam ressonância, como é o caso do comprimento de onda de 280 nm, que é relativo a absorção dos anéis aromáticos presentes na estrutura da lignina, e o comprimento de onda 320, que é relativa a absorção de estruturas de ácidos *p*-hidroxicinâmicos. O perfil do espectro encontrado como média nas sondas presente no cultivo de 7 dias mostra uma pequena diferença em relação ao espectro do material controle. Essa diferença foi observada também no teor de lignina do material biodegradado nesse período, aproximadamente 7% (p/p) de perda em teor. Apesar de o eucalipto biodegradado ter adquirido um aspecto mais poroso, os resultados de microespectroscopia-UV mostram perfis com sobreposição de espectros para os períodos de 14 e 21 dias de biodegradação com o controle. Da mesma forma, a análise por microscopia das paredes celulares do material biodegradado no período de 21 dias, mostrada na Figura 10B, revelam paredes celulares intactas, sem a formação de cavidades ou erosões. Esses resultados indicam que não ocorreu ou houve pouca diferença detectável da modificação de

lignina pelo fungo *M. pulchella*, assim como já indicavam os resultados obtidos pela avaliação do balanço de massa, em que não houve perda progressiva de teores de lignina.

Figura 10 - Espectro de absorção UV da lignina do eucalipto *in natura* e biodegradado no período de 7, 14 e 21 dias (A) Microscopia das paredes celulares presentes na lâmina avaliadas de 21 dias de biodegradação (B).

7 D: sonda presente no cultivo de 7 dias de biodegradação
 14 D: sonda presente no cultivo de 14 dias de biodegradação
 21 D: sonda presente no cultivo de 21 dias de biodegradação
 Fonte: Arquivo próprio.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é útil na visualização de modificações superficiais nos materiais. Esta técnica foi aplicada para identificação de modificações macroscópicas nas estruturas dos materiais biodegradados. Entretanto, através das imagens obtidas (Figura 11), foi observado que as estruturas do eucalipto biodegradado no período de 21 dias estavam conservadas e não foi possível identificar a presença de erosões ou cavidades, mostrando apenas estruturas preservadas. Apesar disso, a técnica foi importante na identificação de hifas do fungo *M. pulchella*, que continuaram aderidas aos materiais biodegradados. As hifas do fungo em estudo foram identificadas no eucalipto após 21 dias de cultivo (Figura 11B e 11D), quando comparadas aos controles do cultivo semi-sólido realizado por 21 dias sem o fungo (Figura 11A e 11C). Já nos cultivos com polpa Kraft, no período de 7 dias, foi possível encontrar várias hifas de *M. pulchella* (Figura 11F), as quais possuem uma largura menor que 10 μm , conforme a escala mostrada. Os autores Johri, Satyanarayana e Olsen (1999) confirmam que a hifa vegetativa de fungos similares ao

M. cinnamomea possui largura entre 3 e 6 μm . A Figura 9E evidencia isto, mostrando a largura das fibras de celulose maiores que 10 μm , conforme escala.

Figura 11 - Imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A: Controle Eucalypto 21 dias de incubação a 45°C.

B: Hifas de fungo (lado direito da figura) evidenciadas no cultivo de 21 dias em meio-semi sólido contendo eucalypto.

C: Controle Eucalypto 21 dias de incubação a 45°C.

D: Hifas de fungo (no centro da figura) evidenciadas no cultivo de 21 dias em meio-semi sólido contendo eucalypto.

E: Controle Polpa 21 dias de incubação a 45°C.

F: Hifas de fungo (lado direito e esquerdo da figura) evidenciadas no cultivo de 7 dias em meio semi-sólido contendo polpa.

Fonte: Arquivo próprio.

5.2.2 Perda de massa e produção de enzimas

Diversos autores apontam que o secretoma muda conforme a fonte de carbono e estado nutricional. No caso dos fungos lignocelulolíticos, o estudo do arsenal enzimático extracelular, ou secretoma, produzido em biomassa “não-lignificada” e lignificada, é uma forma de analisar a resposta do mecanismo molecular que resulta na expressão de diferentes genes que codificam as enzimas necessárias para atuar no processo biodegradativo. Como muitas enzimas são requeridas para a biodegradação dos materiais lignocelulósicos em uma ação colaborativa de despolimerização dos diferentes componentes desses materiais, torna-se interessante analisar a relação de enzimas e a perda de massas e de componentes. Para isso, foi realizada a recuperação do secretoma dos cultivos semi-sólidos utilizados para avaliar a biodegradação nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Após extração das proteínas do cultivo, foi realizada dosagem da atividade enzimática (Figura 12) e da concentração total de proteínas (Figura 13), enfatizando as enzimas hidrolíticas, já que sua ação foi mais expressiva para a perda de massa.

Os dados da Figura 12 mostram os resultados obtidos de perda de massa nos cultivos semi-sólidos com polpa Kraft (Figura 12A) e com eucalipto (Figura 12B), comparando com os níveis de atividade das principais enzimas hidrolíticas dosadas nos seguintes substratos modelos: avicel (celobiohidrolases), CMC (endoglucanases), xilana (xilanases), e goma *locust bean* (mananases) *versus* o período de biodegradação avaliado entre 7 e 21 dias. Os resultados mostram que, em ambos os cultivos (contendo polpa Kraft e eucalipto), a atividade de xilanase se mostrou preponderante. Esse resultado enfatiza a característica do fungo *M. pulchella* em ser um potencial produtor de xilanases conforme reportado por Ribeiro et al (2014a).

Um aspecto interessante de ser observado na Figura 12A é a relação entre a biodegradação da polpa Kraft com os níveis de atividade das enzimas hidrolíticas dosadas. A atividade de xilanase apresenta um patamar superior as demais enzimas dosadas. Entretanto, uma redução de atividade foi observada ao longo do período avaliado. Essa redução pareceu ser concomitante com a perda do teor de xilana, já que praticamente 50% (p/p) do teor de xilana foi removido em 14 dias de biodegradação. No mesmo período, com a remoção de xilana por *M. pulchella*, o resíduo sólido mostrou maior teor de glucana. Neste período, parece ter ocorrido um fenômeno de indução de endoglucanase, já que foi

observado aumento dos níveis de atividade, e, concomitantemente, foi observado o aumento de perda no teor de glucana e da mineralização da polpa Kraft.

Figura 12 - Comparação entre perda de massa de glucana e xilana e níveis de atividade das enzimas celobiohidrolase, endoglucanase, mananase e xilanase observados durante a biodegradação de polpa Kraft (A) e eucalipto moído e lavado (B) por *M. pulchella*.

Fonte: Arquivo próprio.

Outro exemplo identificado por correlacionar o teor presente do componente com a produção de enzimas, foi o patamar diferenciado de atividade de mananases entre os cultivos de polpa Kraft e eucalipto. Os níveis de mananase se mostraram superiores nos cultivos contendo eucalipto (Figura 12B) em relação aos cultivos contendo polpa Kraft (Figura 12A). Essa resposta do metabolismo do fungo pode ser justificada pelo maior teor de mananas existente na composição do eucalipto em relação à polpa Kraft. Assim, pode ser ressaltada a observação de que a perda de massa e a produção de enzimas com comportamentos correlacionados são interessantes do ponto de vista de indução pelo substrato. Um ponto a ser enfatizado é que a mudança do perfil enzimático parece ser dependente da “facilidade” com que as enzimas conseguem despolimerizar os componentes do material, torná-los solúveis e mineralizá-los. Por isso, na Figura 12A, os eventos de perda de massa e níveis de atividade enzimática parecem estar mais correlacionados, por se tratar da biodegradação de um material pouco recalcitrante com alto conteúdo de polissacarídeos mais disponíveis.

Os resultados mostrados na Figura 12B chamam atenção ao fato de que o perfil de enzimas hidrolíticas produzidas ao longo dos 21 dias no cultivo semi-sólido em eucalipto se manteve praticamente constante, já que a atividade da maioria das enzimas avaliadas, com exceção das mananases, praticamente não foi alterada. Essa resposta do metabolismo do fungo foi devido à baixa perda de componentes e, por consequência, baixa formação de compostos solúveis. Os autores Delmas et al. (2012) mostraram, através do estudo das respostas transcricionais de *Aspergillus niger* durante a degradação de palha de trigo moída, que o fungo não consegue identificar uma fonte de carbono prontamente disponível em presença de material lignificado não pré-tratado. Dessa forma, uma menor quantidade de enzimas hidrolíticas são secretadas devido ao estímulo causado pela escassez de fonte de carbono. No entanto, quando o material começa a ser despolimerizado, um arsenal de enzimas hidrolíticas mais completo começa a ser secretado.

O principal obstáculo para a obtenção de um arsenal enzimático completo na presença de eucalipto moído como fonte única de carbono parece ser a presença de lignina e a menor quantidade de poros pelos quais as enzimas hidrolíticas possam penetrar para hidrolisar o material. Essa afirmação é ressaltada pelos resultados da Figura 13 que mostra a comparação entre perda de massa com a mineralização do substrato e a produção de proteínas totais nos cultivos contendo polpa Kraft e eucalipto ao longo de período de biodegradação avaliado entre 7 e 21 dias.

Figura 13 - Perda de massa dos substratos, polpa Kraft (A) e eucalipto moído e lavado (B), comparada com dosagem de proteínas totais extraídas dos cultivos semi-sólidos durante a biodegradação por *M. pulchella* entre 7 e 21 dias.

Fonte: Arquivo próprio.

Os resultados da Figura 13 mostram uma produção de proteínas bastante superior nos cultivos com polpa Kraft em relação aos cultivos com eucalipto. A menor quantidade de proteínas presentes no cultivo com eucalipto pode ser justificada pelo fato de não ter havido novos estímulos ao metabolismo do fungo e, conseqüentemente, ao fato do fungo ter crescido menos nesse material. Apesar disso, foi possível observar tanto a polpa Kraft quanto o eucalipto moído foram utilizados como suporte e fonte de carbono para crescimento de *M. pulchella* e produção de proteínas, mesmo em menores proporções. Isso demonstra que, mesmo em condição de limitação ou escassez de nutrientes, o fungo em estudo modificou sua maquinaria molecular para produzir enzimas e/ou compostos necessários para acessar os polissacarídeos de ambos os materiais.

Uma questão a ser pontuada a respeito da dosagem das proteínas dos cultivos com eucalipto é a interferência por compostos fenólicos e pigmentos do fungo, também extraídos do cultivo durante o procedimento de recuperação das proteínas. Valores altos de absorbância foram obtidos nos controles do cultivo contendo eucalipto, mostrando que a metodologia escolhida para dosagem de proteínas não era eficiente para análise de extratos provindos desse material. Possivelmente, a dosagem das proteínas provindas do cultivo em eucalipto por esta metodologia esteja superestimada. Já para os cultivos com polpa Kraft não foi observado o mesmo grau de interferência.

5.3 Produção e caracterização do secretoma de *M. pulchella*

5.3.1 Produção de proteínas e preparo de amostra

Com o intuito de analisar o secretoma do fungo *M. pulchella*, foram adotadas as seguintes técnicas para avaliar os extratos proteicos recuperados dos cultivos: separação de proteínas por eletroforese SDS-PAGE e análise das proteínas secretadas por espectrometria de massas. Através da análise do secretoma, visou-se estudar o potencial do fungo *M. pulchella* em produzir enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) em condição de indução pelos substratos “não lignificado” (polpa Kraft) e lignificado (eucalipto) em comparação com glicose como fontes únicas de carbono. A análise do secretoma produzido em glicose foi adotada como controle para a condição de indução.

Foram realizadas algumas tentativas de preparo de amostra para análise por eletroforese SDS-PAGE, entretanto essa etapa foi crítica no projeto. Desafios foram

enfrentados, especialmente, em relação ao preparo de amostra provenientes dos cultivos em eucalipto. Embora nenhuma das tentativas de preparo tenha sido bem-sucedida, o melhor resultado obtido para avaliação do perfil proteico está representado na eletroforese em gel SDS-PAGE (Figura 14). As amostras aplicadas nesta eletroforese foram obtidas através da recuperação das proteínas do cultivo semi-sólido de *M. pulchella*, utilizando 40 ml de tampão fosfato (pH 7) 50 mM, acrescido de Tween 60 0,01% (m/v) e PMSF 0,75 mM. O preparo da amostra foi realizado através da concentração por filtros com membranas de ultrafiltração com corte de 3 kDa, resultando em amostras 20X concentradas.

Figura 14 - Eletroforese SDS-PAGE (10%), mostrando perfil proteico obtido a partir de 10 µg do extrato concentrado, obtido após cultivo de *M. pulchella* em meio semi-sólido por 7 dias.

P1, P2 e P3: amostras do cultivo de 7 dias com polpa Kraft em triplicata biológica

E1, E2 e E3: amostras do cultivo de 7 dias com eucalipto em triplicata biológica

MM: Marcador molecular low range Biorad

Fonte: Arquivo próprio.

Visto que a metodologia de preparo de amostra não foi eficiente para definição necessária de bandas proteicas em gel de eletroforese e que o preparo de amostra é crucial para análises proteômicas, fazendo-se necessário garantir a recuperação das proteínas alvo e, ao mesmo tempo, minimizar perda de analitos, contaminações e interferentes (FEIST; HUMMON, 2015; MANN; HENDRICKSON; PANDEY, 2001), optou-se pela produção de enzimas em um cultivo com menor teor de sólidos para obter uma menor quantidade de compostos interferentes solubilizados no extrato enzimático. Para isso, foi realizado cultivo submerso contendo uma concentração de 0,5% (m/v) de biomassa seca, adotando um pré-cultivo submerso com 1% (m/v) de glicose para crescimento micelial. Alguns autores que estudaram o secretoma de ascomicetos também realizaram um pré-cultivo para produção de massa micelial com posterior transferência de micélio para um novo cultivo objetivando a produção de enzimas e análise do secretoma (BORIN et al., 2015; WEBER et al., 2012;

WINGER et al., 2014). Uma das vantagens identificadas no pré-cultivo é a possibilidade de minimizar a fase *lag* de crescimento, reduzindo as diferenças do desenvolvimento do fungo no cultivo através da padronização da massa micelial. Esse fator foi importante para o cultivo de *M. pulchella*, um fungo de crescimento lento com fase *lag* de duração de dois dias. A densidade celular obtida no pré-cultivo de dois dias foi de $1,6 \pm 0,1$ g de micélio seco.L⁻¹. Após transferência da massa de micélio para novos cultivos submersos, foi realizado acompanhamento do açúcar disponível no meio (Figura 15A) e a dosagem de proteínas totais produzidas (Figura 15B) ao longo de 72h. Apesar das modificações realizadas, ainda foi encontrada dificuldade em dosar as proteínas totais dos cultivos contendo eucalipto e polpa Kraft, sendo necessário descontar os interferentes dosados em cultivo controles.

Figura 15 - Detecção de açúcares redutores presentes no meio de cultivo (A) e dosagem de proteínas totais produzidas (B) em meio submerso com 0,5% (m/v) de sólidos ao longo de 72h de cultivo com *M. pulchella*.

Fonte: Arquivo próprio.

Os resultados mostram a ausência de quantidades detectáveis de açúcares redutores nos cultivos contendo polpa Kraft e eucalipto, como fontes únicas de carbono (Figura 15A). Não foi possível, através da densidade ótica (OD 540 nm), verificar a liberação de açúcares redutores nesses cultivos. É provável que a quantidade de açúcares liberados através da despolimerização dos substratos, por ser muito pequena, seja prontamente consumida pelo fungo. Em alguns trabalhos a detecção foi na ordem de $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Borin et al, 2015). Inferimos, então, que, em presença de polpa Kraft e eucalipto, estados de escassez e presença

de açúcares oscilam constantemente. Já através do acompanhamento de açúcares redutores presentes no cultivo com glicose, foi possível observar o esgotamento progressivo de açúcar. Após 48h de cultivo, cerca de 70% dos açúcares redutores presentes inicialmente haviam sido consumidos. Apesar da queda na concentração de açúcares ter sido baixa entre os períodos de 48h a 72h no cultivo em glicose, a comparação com a dosagem de proteínas totais produzidas no mesmo período, mostrou que as concentrações foram maiores nos cultivos com polpa Kraft e eucalipto, enquanto a dosagem de proteínas no cultivo com glicose apresentou pequena redução (Figura 15B). Assim, foi escolhido utilizar a incubação de 72h para análise do secretoma produzido nas condições de indução pelo substrato para polpa Kraft e eucalipto e, para o cultivo em glicose, uma condição que indicava início de repressão catabólica.

Ao final de 72h, o secretoma foi recuperado e o pH final dos cultivos foi aferido. Por se tratar de cultivos com pH não controlado, foram observadas variações com relação ao pH inicial (7,0). As variações foram mais expressivas para os cultivos em polpa Kraft e eucalipto. Os valores médios dos pHs aferidos foram $8,2 \pm 0,2$, $8,3 \pm 0,1$ e $7,34 \pm 0,03$ para os cultivos com polpa Kraft, eucalipto e glicose, respectivamente, enquanto os pHs aferidos para os controles foram 7,01, 6,88 e 6,78, seguindo a mesma ordem. O aumento do pH nos cultivos com substratos complexos indica que não houve produção de metabólitos ácidos durante o cultivo. É possível que o fungo controle o pH de outras formas, pois tanto seu metabolismo quanto as enzimas que degradam biomassa são dependentes de pH ideal para catálise. Em uma avaliação do extrato proteico, deve-se ter em mente a possibilidade da secreção de proteases e peptidases. Estas enzimas são reportadas por regular muitas funções do metabolismo, como o catabolismo de proteínas, crescimento celular e migração, inclusive contribuindo no transporte de proteínas secretadas através de membranas (Rao et al, 1998).

Os secretomas recuperados dos cultivos de 72h, foram clarificados e concentrados cerca de 100X. As amostras das triplicatas biológicas de cada cultivo foram submetidas a análise de proteínas através de eletroforese SDS-PAGE, que permite a separação de uma mistura de proteínas pelo peso molecular, e o perfil proteico de cada cultivo foi obtido conforme Figura 16.

O resultado do perfil proteico entre as triplicatas biológicas dos secretomas produzidos em polpa Kraft, eucalipto e glicose se mostrou diferencial em termos de intensidade e perfil de bandas. Após a remoção da interferência do ruído de fundo através do software Image Lab, juntamente com ajuste visual, foram identificadas poucas bandas

que se mostraram sendo específicas para apenas em uma condição de indução pelo substrado, mostradas na Figura 14 B.

Figura 16 - Eletroforese SDS-PAGE, mostrando perfil proteico obtido a partir de 15 µg do extrato proteico concentrado 100X, provindo do cultivo de *M. pulchella* em meio submerso com 0,5% (m/v) de sólidos por 72 h (A) Detecção de bandas pelo software Image Lab (B)

P1, P2 e P3: amostras do cultivo com polpa Kraft em triplicata biológica
 E1, E2 e E3: amostras do cultivo com eucalipto moído e lavado em triplicata biológica
 G1, G2 e G3: amostras do cultivo com glicose em triplicata biológica
 MM: Marcador molecular (Low range Bio-Rad)
 Fonte: Arquivo próprio.

O perfil proteico obtido para o secretoma de polpa Kraft mostrou uma maior concentração aparente de proteínas, devido a maior intensidade de suas bandas, enquanto o perfil proteico das triplicatas do secretoma de eucalipto e glicose aparecem menos intensos. Apesar de terem sido utilizadas para as análises as mesmas concentrações de proteínas para as três condições (15 µg), é possível que variações possam ter ocorrido devido a dosagem superestimada pela metodologia adotada, a qual pode ser atribuída à presença remanescente de compostos fenólicos e pigmentos na amostra, conforme já mencionado. Outra hipótese para o fato de uma menor intensidade de proteínas visíveis na eletroforese é o fato de que o corante comassie utilizado para corar as proteínas no gel não ser sensível para revelar bandas de proteínas com concentrações baixas. Dessa forma, é possível que uma diversidade de proteínas em pequenas concentrações possa não ter sido revelada pela interferência do ruído de fundo de corrida de eletroforese.

5.3.2 Análise do secretoma de *M. pulchella*

Para analisar a diversidade de proteínas produzidas por *M. pulchella* nas condições de indução por polpa Kraft, eucalipto e glicose, os secretomas foram produzidos de acordo

com parâmetros de cultivo estabelecidos foram recuperados, concentrados e foi submetido a análise de espectrometria de massas e sequenciamento dos peptídeos das bandas proteicas.

A espectrometria de massas gerou vários espectros MS/MS (m/z) bem definidos com *score* maior que 40, que indicam identificações de aminoácidos com alto nível de confiança (acima de 95%). Entretanto, a busca de peptídeos não foi realizada diretamente com as proteínas de *M. pulchella*, pois não haviam informações de seu genoma ou proteoma publicados até o momento. A identificação de peptídeos e proteínas utilizando o proteoma do organismo em estudo é o ideal, porque a técnica de espectrometria de massas escolhida é baseada na identidade de massa predita *in silico* (*peptide fingerprint*, PMF), a qual permite a comparação com as massas dos peptídeos identificadas após a fragmentação (MANN; HENDRICKSON; PANDEY, 2001). Apesar do PMF ser muito acurado e, inclusive, com aplicação para identificação de gênero e espécie de organismos conforme demonstraram Qian et al. (2008) e Singhal et al. (2015), é necessária cautela na análise dos dados e na utilização de bancos de dados públicos (KNUDSEN; CHALKLEY, 2011).

O melhor resultado para identificação de proteínas dos secretomas de *M. pulchella* foi obtido com o banco de dados do proteoma de *M. cinnamomea* CBS 343.55, sendo possível identificar 181 proteínas (31362 espectros) com alto nível de confiança de acordo com parâmetros estabelecidos pelo algoritmo *Peptide Prophet* (1% falso positivo (FDR), 99,0 % de confiança para identificação de proteínas, ao menos 2 peptídeos identificados para cada proteína). Já a identificação de proteínas por meio da busca nos demais bancos de dados gerou um número inferior de proteínas identificadas: 51 proteínas (5049 espectros) com o banco de dados Swissprot e 15 proteínas (963 espectros) com o banco Mycoclap, considerando os mesmos parâmetros de confiança de identificação estabelecidos anteriormente. Dentre as 51 proteínas identificadas através do banco Swissprot, apenas 6 proteínas eram CAZymes, enquanto com o banco Mycoclap, todas as 15 proteínas eram CAZymes, por se tratar de um repositório especializado em proteínas caracterizadas ativas em lignocelulose e oriundas de fungos. O provável motivo para a baixa identificação de proteínas nos bancos de dados públicos testados é atribuído à existência de poucas sequências de proteínas de *M. pulchella* depositadas (1 proteína depositada, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=465707>, consulta realizada em 01/02/2017). Por isso, na análise dos secretomas foram encontradas apenas proteínas com alta taxa de conservação entre espécies relacionadas ao fungo *M. pulchella*, principalmente no caso da busca com o banco Mycoclap e com o proteoma de *M.*

cinnamomea CBS 343.55. Poucas proteínas de organismos não relacionados com a espécie em estudo foram encontradas através do banco de dados Swissprot. Dentre elas, estão apenas tipos de queratinas e outras proteínas de origem humana, que são consideradas exceções à análise do secretoma, pois constituem-se em contaminantes comuns em laboratórios durante a manipulação da amostra.

Está disponível no material suplementar (apêndice C) uma listagem das 181 proteínas identificadas, mostrando o número de acesso no genoma de *M. cinnamomea* CBS 343.55, a provável descrição obtida pelo NCBI, o número de acesso da proteína no NCBI, a anotação da função, os domínios CAZy, a massa molecular, o pI calculado (sem peptídeo sinal) e informações de predição de localização, como por exemplo, se a proteína é secretada por devido ao peptídeo sinal ou se passa por uma via de secreção não-clássica, se é proteína transmembrana e a provável localização da proteína dentro da via de secreção pelo *software* Protcom com a opção de utilizar a anotação *GO annotation* (*Gene Ontology*).

O conjunto de proteínas identificadas apresentou massa molecular entre 12 e 205 kDa e a média de pI de 5,6. Dentre as 62 CAZymes identificadas pela anotação do dbCAN, foi encontrado um pI médio de 5,0, com destaque para uma AA2 com pI calculado de 8,73. O resultado da predição de localização mostrou que 47% das proteínas possuem peptídeo sinal (85 proteínas). Dentre as proteínas que não apresentaram peptídeo sinal predito, 60% delas apresentaram algum tipo de predição de localização que estão relacionados ou a mecanismos não clássicos de secreção (16 proteínas), ou a proteínas transmembrana (7 proteínas), ou por serem consideradas extracelulares (EC), ou ancoradas à membrana plasmática (LMP) (36 proteínas) pelo *software* Protcom. Dentre as demais proteínas, 24 foram preditas por terem localização relacionadas a funções no citoplasma (CT) e outras 15 proteínas tiveram localizações preditas relacionadas a funções exclusivamente mitocondrial (MT), nuclear (NUC), peroxisomal (PS) e no retículo endoplasmático (RE) em menores proporções. A Figura 17 mostra as proteínas do secretoma global (três condições testadas) segundo os dados de predição de localização.

Figura 17 - Distribuição das proteínas identificadas no secretoma global em relação a predição de localização pelo *software* Protcom com a anotação *GO annotation* (A) Distribuição em diagrama de Venn baseada na presença de peptídeo sinal, predição de secreção não clássica e proteína transmembrana (B)

CG - Complexo de golgi, CT - Citoplasmática, EC - Extracelular (Secretada), LMP - Ligada à Membrana plasmática, LS - Lisossomal, MT - Mitochondrial, MP - Membrana plasmática, NUC- Nuclear, PS- Peroxissomal, RE - Retículo endoplasmático

Barras sem numeração indicam a existência de 1 proteína.

Fonte: Arquivo próprio.

Considerando que, dentre todas as proteínas identificadas, 62 eram CAZymes e apenas três delas não foram identificadas com nenhum mecanismo de secreção, sendo duas identificadas com função relacionada ao citoplasma (GH31 e CE12 putativa) e uma com função relacionada ao retículo endoplasmático (GH38), entendemos que a composição do secretoma global produzido está adequada, já que na via de secreção há um fluxo de proteínas intenso e muitas desempenham funções inter-relacionadas dentro e fora da célula, podendo estar relacionadas com ligação, transporte dentre outras funções. A Figura 18 mostra a distribuição de funções das proteínas conforme a assinatura no domínio conservado (*motif*, identificado pelo *software* InterProScan) no secretoma global de *M. pulchella* e das

proteínas identificadas por condição de indução em biomassa “não-lignificada” (polpa Kraft), lignificada (eucalipto) e em glicose.

Figura 18 - Distribuição de proteínas obtidas no secretoma global (A) e nas condições de indução em polpa Kraft (B), eucalipto (C) e glicose (D), segundo a classificação de função baseada em seu domínio conservado.

Numeração ao redor do gráfico de pizza indica quantidade de proteínas preditas com as respectivas funções descritas conforme legenda de cores.

Fonte: Arquivo próprio.

Para a avaliação de proteínas preditas diferencialmente em cada secretoma, foi adotado como positiva a identificação de uma proteína quando ela fora encontrada em pelo menos uma das triplicatas biológicas do respectivo secretoma. Os resultados das Figuras 18 e 19 mostram a identificação de proteínas secretadas em todas as condições de indução. Uma maior quantidade de proteínas foi identificada no secretoma produzido em polpa Kraft, seguido por eucalipto e glicose, contando com 149, 139 e 137, respectivamente, sendo que um total de 95 são comuns em todos os secretomas e 12, 3 e 17 foram as quantidades

produzidas exclusivamente em polpa Kraft, eucalipto e glicose, respectivamente (Figura 19A). Proteínas que podem ser destacadas por ter sua expressão modificada em relação a indução pelo substrato foram as CAZymes, as proteases/peptidases e as proteínas classificadas como diversas, as quais englobam funções relacionadas ao metabolismo. As CAZymes foram as proteínas em que a diferença de indução pelo substrato mais sobressaiu. O secretoma produzido em polpa Kraft foi aquele identificado com maior número de CAZymes: 60, contra 47 e 34 produzidas em eucalipto e glicose, respectivamente (Figura 19B e 19C).

Figura 19 - Distribuição das proteínas identificadas nos diferentes substratos (A), distribuição das CAZymes (B), distribuição de famílias CAZy (C) e distribuição das CAZymes por número de proteínas identificadas, segundo condição de indução pelo substrato (D).

Fonte: Arquivo próprio.

Os resultados da Figura 19C mostram o número de CAZymes encontradas em cada secretoma classificadas por as famílias: glicosil hidrolases (GHs), carboidrato esterases (CEs), atividade auxiliar (AAs), e CAZymes putativas. Os resultados indicam que *M. pulchella* secreta, predominantemente, enzimas hidrolíticas (GHs), conforme esperado para o fungo em estudo. A quantidade de glicosil hidrolases (GHs) soma 62% do total de CAZymes expressas em cada um dos três secretomas avaliados, com destaque para as famílias GH18 (quitinases, endo- β -acetilglucosaminidase) e GH3 (β -glicosidases, β -1,4-xilosidases e α -arabinofuranosidases) encontradas em maior número conforme mostra Figura 17D. O secretoma proveniente de polpa Kraft foi o que apresentou o maior número de GHs (37), enquanto o secretoma em eucalipto e glicose apresentaram 29 e 21 GHs, respectivamente. Esse resultado comprova o potencial do uso de mecanismos hemicelulolíticos para a biodegradação dos materiais.

Na Figura 19C é mostrado que a quantidade de enzimas da família de AAs também ressaltou dentre as proteínas identificadas, sendo 13, 12 e 7 o número de proteínas em polpa Kraft, eucalipto e glicose, respectivamente. As famílias que se destacaram dentre as enzimas oxidativas foram: AA7 (quito/glucooligossacarídeo oxidase) e AA9 (*Lytic polysaccharide monoxygenase*, LPMOs), conforme Figura 19D. As enzimas AAs identificadas nos secretomas somaram cerca de 22%, 26% e 21% em relação ao total de CAZymes em polpa Kraft, eucalipto e glicose, respectivamente, indicando que a distribuição pode ser resultante da condição de indução.

Poucas enzimas oxidativas das famílias AA2 (peroxidase), AA5 (*copper-radical oxidase*) e AA8 (celobiose desidrogenase, CDH) foram identificadas apenas no secretomas produzidos em polpa Kraft e eucalipto. Essas enzimas estão relacionadas principalmente à degradação de lignina ou, no caso da CDH, envolvida na degradação indireta de polissacarídeos. A baixa quantidade dessas enzimas identificadas nos secretomas aponta a ineficiência do fungo em estudo na degradação de lignina. Essa afirmação é comprovada através quantidade superior de enzimas oxidativas dessas famílias encontradas nos secretomas dos fungos de degração branca. Hori et al., 2014 estudaram o secretoma do fungo de degradação branca *C. subvermispora* e identificaram 11 proteínas das famílias AA2 e três proteínas da família AA1. Os autores Valadares et al. (2016) estudaram o secretoma de outro fungo de degradação branca, *P. ostreatus*, e mostraram a identificação de 5 proteínas da família AA1. Outro aspecto a ser considerado é que autores Ribeiro et al. (2014a) não detectaram atividade de lacases quando o extrato bruto de *M. pulchella* foi incubado com

ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico (ABTS). Como mostrou a predição de localização enzima AA2 (função predita pelo dbCAN), na verdade é uma flavoenzima e está relacionada a funções também na mitocôndria. Apesar de seu domínio catalítico conservado alinhar com oxidases, outros trabalhos também a indicaram como intracelular e não atuante na degradação de lignina (MARTÍNEZ et al., 2005).

A Figura 19B mostrou 29 proteínas identificadas em todos os secretomas através do diagrama de venn. O resultado da Figura 19D mostrou as famílias CAZy que possuem o mesmo número de proteínas identificadas em todos os secretomas. Essas famílias compreendem enzimas acessórias que atuam na despolimerização do material lignocelulósico: em oligossacarídeos (GH1, GH3, GH38) e em ligações ramificadas (GH81, GH132, CE15, CE16), entre outras enzimas que apresentam funções diversas (AA11, GH13, GH65, GH72). Como o secretoma em glicose foi utilizado como controle da condição de indução e pelo fato de uma menor quantidade de CAZymes ter sido encontrada, inferimos que essas proteínas presentes em todos os secretomas sejam enzimas constitutivas. As enzimas induzidas e detectadas exclusivamente no secretoma de polpa Kraft foram 10 CAZymes, incluindo as famílias GH6 e GH7, enquanto nos secretomas produzidos em eucalipto e glicose foi identificada apenas 1 CAZyme exclusiva.

Esses resultados evidenciam que o maquinário do fungo *M. pulchella* é essencialmente hidrolítico. Em ambas as condições de indução (em biomassa lignificada e “não-lignificada”), foi apresentada uma maior quantidade de CAZymes identificadas com função na despolimerização de material lignocelulósico se comparado com o secretoma em glicose. Entretanto, em presença de eucalipto, a indução pareceu ser menos expressiva devido a uma provável condição de escassez de fonte de carbono. Nessa condição, foi observada maior produção de proteases/peptidases, as quais podem estar relacionadas a condições de estresse metabólico. Já em polpa Kraft, foi considerada a melhor condição de indução enzimática pelo disponibilidade dos polissacarídeos, possibilitando o crescimento do fungo e produção de proteínas. Nessa condição, foi possível identificar enzimas modelos mais conhecidas para hidrólise de celulose e hemicelulose (GH1, GH3, GH6, GH7, GH10, GH11, GH12, GH55, GH71, GH72, GH81, GH132), mostrando ser um secretoma interessante para ser avaliado em ensaios de hidrólise. Já o secretoma obtido no com o cultivo em glicose foi o que apresentou maior quantidade de enzimas relacionadas ao metabolismo do fungo.

Além das CAZymes, um grupo interessante de proteínas com as descrições de proteínas de alergia (*allergen*) e antígeno de parede celular (*antigen cell wall*) foram encontradas em todos secretomas. Através da ferramenta InterproScan, o domínio funcional de uma dessas proteínas apresentou um *motif* relacionado à fitotoxidade, indicando a capacidade do fungo em colonizar plantas. Foi reportado na literatura que alguns grupos de proteínas *allergen* estão relacionados com domínios *expansin-like*, que ajudam a afrouxar as fibras de celulose (BROTMAN et al., 2008).

5.3.3 Caracterização do secretoma de *M. puchella*

A caracterização da atividade enzimática para confirmar a função predita para as proteínas identificadas nos secretomas é relevante para entender se a capacidade catalítica dos secretomas é promissora para aplicação em hidrólise enzimática de materiais lignolíticos. A caracterização do secretomas foi realizada em duas etapas. A primeira, consistiu em estudar a cinética e a atividade enzimática das principais enzimas da família de glicosil hidrolases (GHs): endoglucanases, celobiohidrolases e xilanases, e algumas enzimas acessórias. Em uma segunda etapa, tentou-se entender a ação colaborativa/sinérgica das CAZymes produzidas através de ensaios de hidrólise.

5.3.3.1 Secretoma hidrolítico

Os dados apresentados na Tabela 5 mostram uma compilação das caracterizações enzimáticas em U.ml^{-1} e normalizado para quantidade de proteínas U.mg^{-1} . Foi utilizado um gradiente de cores para destacar as atividades mais expressivas em cada grupo de enzimas avaliado: celulases, xilanases e algumas enzimas acessórias, avaliadas segundo substratos modelos escolhidos. As cinéticas realizadas para definir os níveis enzimáticos encontram-se disponíveis no material suplementar (apêndice D). Os resultados de cinética foram explorados apenas na condição em que a atuação catalítica sobre o substrato modelo apresentou nível de atividade maior que $0,05 \text{ U.ml}^{-1}$ em 30 minutos de reação para atividades celulolíticas e em 10 minutos de reação para atividades xilanolíticas.

Tabela 5 - Painel de substrato contendo níveis de atividade enzimática testados sobre diferentes substratos modelos para os secretomas obtidos de polpa Kraft, eucalipto e glicose.

	Substrato	Atividade (U.ml ⁻¹)			Atividade (U.mg ⁻¹)		
		Polpa Kraft	Eucalipto	Glicose	Polpa Kraft	Eucalipto	Glicose
Celulases	CMC	3,3 ± 0,1	0,63 ± 0,05	0,21 ± 0,03	7	1,41	0,4
	FPU	0,264 ± 0,002	< 0,05	< 0,05	0,796	< 0,1	< 0,1
Xilanases	Xilana de <i>birchwood</i>	212 ± 16	7 ± 2	0,86 ± 0,02	451	15	1,59
	Arabinoxilana de <i>wheat</i>	315 ± 7	1,48 ± 0,07	ND	671	3,29	ND
	pNPX	16 ± 1	18,4 ± 0,5	0,3	35	41	0,6
Enzimas acessórias	pNPA	36 ± 4	19 ± 1	1,23 ± 0,08	77	43	2,28
	pNPG	55,7 ± 0,9	45 ± 2	11,9 ± 0,6	118,5	99	22
	Xiloglucana (<i>tamarind seed</i>)	0,66 ± 0,07	0,079* ± 0,006	0,058* ± 0,006	1,4	0,18*	0,11*
	β -glucana* (<i>Barley</i>)	2 ± 0,04	0,792 ± 0,009	0,4 ± 0,1	4,25	1,76	0,7
	Goma <i>locust bean</i>	0,066 ± 0,004	0,10 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,14	0,22	0,09
	Arabinana (<i>sugar beet</i>)	ND	< 0,05*	< 0,05*	ND	< 0,1*	< 0,1*
	Arabinana não-ramificada	< 0,05*	0,063* ± 0,009	0,05* ± 0,01	< 0,1*	0,1*	0,1*
	Galactomanana (<i>carob</i>)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Manana	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND – Não detectada. Atividades não-detectadas foram consideradas 0 U.ml⁻¹ ou 0 U.mg⁻¹. Atividades com níveis inferiores a 0,05 U.ml⁻¹ ou 0,01 U.mg⁻¹ foram reportadas apenas como < 0,05 U.ml⁻¹ ou < 0,1 U.mg⁻¹, devido a colaboração hidrolítica ser muito pequena. * Atividade realizada em 30 min de reação.

Fonte: Arquivo próprio

Os resultados da Tabela 5 mostram que os secretomas obtidos do fungo *M. pulchella* apresentam níveis de atividades mais expressivos em polpa Kraft, níveis intermediários foram detectados para em eucalipto, enquanto que, em glicose, os níveis de atividades foram ínfimos. Os maiores níveis de atividade foram detectados nas enzimas ativas nos substratos modelos xilana e arabinoxilana (endo-xilanases) e no substrato sintético pNPX (β-xilosidases), nas enzimas acessórias ativas nos substratos sintéticos pNPA (arabinofuranosidases) e pNPG (β-glicosidases) e, dentre as enzimas celulolíticas, os maiores níveis de atividade foram nas enzimas ativas em CMC (endoglucanases).

Com os resultados obtidos, foi possível validar a função predita de muitas CAZymes encontradas nos secretomas. Deste modo, podemos validar os seguintes grupos de enzimas, relacionadas à degradação de celulose: β -1,4-endoglucanases (GH7, GH12), celobiohidrolases (GH6, GH7) e β -glicosidases (GH1, GH3); relacionadas à degradação de xilana: endo-xilanases (GH10, GH11) e β -xilosidases (GH1, GH3); relacionadas à degradação de xiloglucana: β -1,4-endoglucanases (GH12), α -L-arabinofuranosidases (GH2, GH3); relacionadas à degradação de β -glucana: β -1,3-endoglucanases (GH55, GH71, GH72, GH81, GH132), β -1,4-endoglucanases (GH12) e β -glicosidases (GH81). Já as proteínas preditas como manosidases das famílias GH2, GH38, GH47, GH92 e GH125 não obtiveram níveis de detecção pelos substratos modelos testados. Uma atividade relativamente baixa foi detectada com o substrato goma *locust bean* que caracterizam as mananases. Em relação a degradação de arabinina, apesar das clássicas famílias de endo-arabinanases não terem sido identificadas no secretoma, é possível que enzimas com ação cruzada estejam atuando, gerando atividade reduzida detectada nos substratos modelos arabinana e arabinana não-ramificada.

Para explorar a capacidade hidrolítica de um substrato não modelo, foi escolhido o secretoma produzido em polpa Kraft, uma vez que este extrato apresentou níveis de atividades hidrolíticas superiores em relação aos demais, além de ser um extrato mais limpo em termos de presença de composto fenólicos, os quais poderiam interferir como doadores de elétrons para as enzimas oxidativas. Deste modo, foi realizado ensaio de hidrólise em polpa Kraft (substrato não modelo), aplicando alta carga de proteínas em uma cinética de hidrólise até 48h. O ensaio contendo carga alta de proteínas apresentava carga de 50 mg de proteínas.g⁻¹ de celulose (1 mg de proteínas em 20 mg de substrato) em uma hidrólise com baixa consistência de sólidos 2% (p/v) e volume final de 1 mL. Os resultados dessa cinética para a conversão de glucana e de xilana estão mostrados na Figura 20.

Foi observado que, apesar da cinética empregada não definir bem as velocidades iniciais de hidrólise (primeiro ponto amostral 12 h), foi possível identificar um patamar elevado de conversão, atingindo um total de $38 \pm 1\%$ e $74 \pm 1\%$ de conversão de glucana e de xilana, respectivamente, ao final de 48h. A relação entre os níveis de atividade de endoglucanase - EG (CMC), celobiohidrolases - CBH (papel de filtro-FPU), β -glicosidases - BG (pNPG) e xilanase - XL (xilana de *birch*) dosados nos respectivos substratos modelos resulta na seguinte razão de ação: 8,8 : 1 : 148,9 : 566,6 (EG:CBH:BG:XL), em termos de

U.mg⁻¹, por isso uma menor ação nas regiões cristalinas era esperada, a qual refletiu em conversão de glucana mais baixa se comparada a conversão de xilana.

Figura 20 - Conversão percentual de glucana e xilana resultantes do ensaio de hidrólise com alta carga de proteínas e Polpa Kraft em 2% (p/v) de sólidos por 48 h.

Tampão fosfato 50 mM (pH 7,0)

Polpa Kraft: mesma composição química mostrada no item 5.2

Fonte: Arquivo próprio.

Vale lembrar que para este ensaio de hidrólise foi utilizado secretoma concentrado 100X e testou-se todo o potencial hidrolítico do fungo *M. pulchella* com alta carga de proteínas. Apesar disso, esse resultado demonstra o potencial do secretoma de *M. pulchella* na ação catalítica sobre materiais lignocelulolíticos pré-tratados, além do alto potencial em remoção de xilana e na ação em celulose amorfa. Inclusive, a presença de β -glicosidases bastante ativas nesta mistura enzimática reduz a inibição de celulasas pelo produto de hidrólise da celulose (celobiose), permitindo a conversão de glucana observada, sem a necessidade de suplementação externa. O resultado também corrobora com o obtido anteriormente para a biodegradação de polpa Kraft, a qual indicou alta mineralização de xilana e uma mineralização mais tardia de glucana.

5.3.3.2 Secretoma oxidativo

Com o objetivo de validar o potencial oxidativo do secretoma de *M. pulchella*, foi preterido avaliar a ação das enzimas da família AA9 (3 proteínas identificadas no secretoma de polpa Kraft). Foram testados 12 cenários de ensaios de hidrólise após 48h de reação, sendo seis cenários de hidrólise enzimática com polpa de dissolução (substrato com apenas

2% de lignina) e outros seis cenários com o substrato modelo de celulose microcristalina (Avicel). Todos os ensaios foram conduzidos empregando baixa carga de proteínas do extrato de *M. pulchella* para minimizar o efeito pronunciado da ação de suas enzimas hidrolíticas, principalmente das endoxilanases (GH10 e GH11) e β -glicosidases (GH1, GH3). Dessa forma, decidiu-se realizar os ensaios com carga de proteínas 10X reduzida, comparada ao ensaio de hidrólise com polpa Kraft (item 5.3.3.1). Os ensaios contendo baixa carga de proteínas apresentavam carga de 5 mg proteínas.g⁻¹ de celulose (0,1 mg de proteínas em 20 mg de substrato) em uma hidrólise com baixa consistência 2% (m/v) em volume final de 1 mL). A decisão de utilizar menor carga de proteínas foi também devido ao fato de pequenas quantidades de enzimas AA9 serem requeridas para verificar o incremento de conversão de celulose. Além disso, para testar o efeito colaborativo/sinérgico entre celulasas (Celluclast 1.5L) e as enzimas AA9 produzidas por *M. pulchella*, foi utilizado um doador de elétrons sintético externo, o ácido gálico, uma vez que os ensaios foram realizados com substratos relativamente “puros” em composição de celulose. A partir da construção desses cenários foram obtidos os resultados apresentados na Figura 21.

Observa-se na Figura 21 que, tanto em polpa de dissolução (cenário 1) quanto em Avicel (cenário 7), a hidrólise com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella* resultou em uma baixa conversão de glucana, sendo $7,1 \pm 0,3\%$ e $3,8 \pm 0,2\%$ respectivamente. Com a adição de ácido ascórbico aos ensaios de baixa carga de proteínas, não foi gerado impacto na conversão de glucana em ambas reações com polpa de dissolução, já com Avicel um pequeno aumento foi observado (não significativo). Foram obtidas as seguintes conversões de glucana, $6 \pm 2\%$ e $4,2 \pm 0,2\%$ com polpa de dissolução (cenário 2) e Avicel (cenário 8), respectivamente. Esse resultado mostra que, apesar da presença de um doador de elétrons externo, não houve aumento de conversão por sinergia entre as enzimas AA9 e as demais enzimas presentes no secretoma de *M. pulchella*. A não observação de efeito de sinergia entre celulasas/AA9 do próprio secretoma pode ser justificada pelo baixo nível de atividade de celobiohidrolases, demonstrada pelo baixo valor detectado de celulasas totais (FPU). Esse resultado mostra, ainda, uma maior conversão de glucana com polpa de dissolução se comparada a conversão de glucana com Avicel. Como os materiais são muito semelhantes em termos de composição química, assumimos existem diferenças em termos de morfologia das cadeias de celulose nos dois materiais, já que a conversão da celulose da polpa de dissolução parece ser favorecida com o secretoma de *M. pulchella*. Os resultados

dos ensaios com baixa carga de proteína certificaram a baixa ação das enzimas hidrolíticas, como havia sido proposto inicialmente.

Figura 21 - Conversão percentual de glucana resultantes dos ensaios de hidrólise com baixa carga de proteínas de *M. pulchella* e suplementação com coquetel Celluclast 1.5 L com polpa de dissolução (A) e com Avicel (B) em reação contendo 2% (m/v) de sólidos por 48 h.

Cenários de hidrólise enzimática:

- 1- Extrato baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*.
 - 2- Extrato baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, acrescido de ácido ascórbico (AA).
 - 3- 10 FPU Celluclast 1,5L. g⁻¹ de celulose.
 - 4- 10 FPU Celluclast 1,5L. g⁻¹ de celulose na hidrólise, acrescido de ácido ascórbico (AA).
 - 5- 10 FPU Celluclast 1,5L. g⁻¹ de celulose, suplementado com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*.
 - 6- 10 FPU Celluclast 1,5L. g⁻¹ de celulose, suplementado com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, acrescido de ácido ascórbico (AA).
 - 7- Extrato baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*.
 - 8- Extrato baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, acrescido de ácido ascórbico (AA).
 - 9- 10 FPU Celluclast 1,5L. g⁻¹ de celulose.
 - 10- 10 FPU Celluclast 1,5L. g⁻¹ de celulose, acrescido de ácido ascórbico (AA).
 - 11- 10 FPU Celluclast 1,5L. g⁻¹ de celulose, suplementado com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*.
 - 12- 10 FPU Celluclast 1,5L. g⁻¹ de celulose, suplementado com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, acrescido de ácido ascórbico (AA).
- AA: Ácido ascórbico 1mM
 Tampão citrato 50 mM (pH 4,8)
 Fonte: Arquivo próprio.

Nos cenários de hidrólise com polpa de dissolução, utilizando o coquetel comercial Celluclast 1.5L, foi observado que a conversão de glucana atingiu $28 \pm 5\%$ no cenário 3 e $25 \pm 10\%$ no cenário 4, com acréscimo de ácido ascórbico. Já nas hidrólises com Avicel, utilizando o mesmo coquetel comercial, a conversão de celulose atingiu $33 \pm 1\%$ no cenário 9 e $34 \pm 6\%$ no cenário 10, o qual continha acréscimo de ácido ascórbico. O resultado das conversões de glucana entre os cenários 3 e 4, com polpa de dissolução, e 9 e 10, com Avicel,

não mostrou diferenças significativas de conversão de glucana com o acréscimo de ácido ascórbico. Por isso, inferimos que a adição de doadores de elétrons externos não afeta a conversão de glucana nos ensaios contendo apenas Celluclast 1.5L, demonstrando que esses cenários servem como controle de interferentes para as reações de hidrólise suplementadas por extrato de *M. puchella*. Ao contrário do que foi observado na despolimerização com secretoma do fungo em estudo, a hidrólise utilizando o coquetel comercial em Avicel foi mais eficiente que em polpa de dissolução. Esse fato pode ser justificado pela maior proporção de enzimas celobiohidrolases no coquetel comercial em relação as demais enzimas hidrolíticas, aumentando a hidrólise em regiões cristalinas (razão de 7,1:1,3:1, EG:CBH:BG, reportada pelos autores Valadares et al. (2016)). Entretanto, devido a baixa quantidade de β -glicosidases neste coquetel, a reação torna-se limitada pela inibição pelo produto de hidrólise (celobiose e celobio oligômeros) conforme também reportado pelos autores Valadares et al. (2016).

Nos cenários 5 e 11, que empregaram hidrólise com coquetel Celluclast 1.5L suplementada com baixa carga de proteínas do secretoma de *M. pulchella*, foi possível observar uma grande melhora na conversão de glucana e sinergia entre as enzimas dos extratos. A sinergia é justificada, pois ambas condições de reação de hidrólise suplementada com o secretoma em estudo proporcionaram uma conversão mais expressiva de glucana em relação aos valores de conversão obtidos em reações separadas. Na reação com polpa de dissolução, foi possível atingir conversão de glucana de $48 \pm 2\%$ e na reação com Avicel foi atingido $41 \pm 2\%$ de conversão. Ambos os cenários mostraram aumentos significativos ($p < 0,05$) em relação aos cenários contendo apenas Celluclast. Na reação de hidrólise com polpa de dissolução foi possível observar um incremento de conversão de glucana de cerca de 20%, já na hidrólise com Avicel foi observado um aumento de 8% na conversão de glucana. Esse efeito de sinergia pode ter ocorrido pela presença de enzimas hidrolíticas ou oxidativas do secretoma de *M. pulchella*, todavia, ao considerar a diferença de hidrólise entre os substratos, os dados indicam que o efeito sinérgico parece estar mais relacionado ao incremento de enzimas hidrolítica na reação.

Em relação aos cenários contendo ensaios com Celluclast, suplementados com o secretoma e acrescidos de ácido ascórbico (cenário 6 e 12), conversões de glucana de $52 \pm 2\%$ e $42 \pm 2\%$ foram proporcionadas nas reações com polpa de dissolução e Avicel, respectivamente. Ambos os cenários, 6 e 12, apresentaram aumento de conversão de glucana significativo ($p < 0,05$) em relação aos cenários controle nas reações apenas com Celluclast

1.5L ou adicionado de ácido ascórbico, em ambos materiais testados (cenários 3, 4, 9 e 10), demonstrando uma clara sinergia entre as enzimas presentes em Celluclast 1.5L e o secretoma de *M. pulchella*. Entretanto, a avaliação comparativa entre os cenários 5 e 6 (com polpa de dissolução) e 11 e 12 (com Avicel) mostra uma pequena diferença entre as médias de conversão de glucana obtida nas reações suplementadas com o secretoma em estudo e acrescidas de ácido ascórbico. Assim, não foi possível concluir, estatisticamente, que a sinergia encontrada é atribuída ao efeito das celulases/AA9, apesar dos resultados das reações mostrarem que existe um efeito mais reduzido.

Uma avaliação comparativa entre os resultados da hidrólise com polpa de dissolução e Avicel tendem a indicar uma maior possibilidade desse incremento de hidrólise observado ser atribuído aos altos níveis de atividades de xilanas e β -glicosidases, já que as conversões em polpa de dissolução foram maiores que as encontradas nas reações com Avicel. Apesar de ter sido utilizada baixa carga de proteínas do secretoma em estudo, ainda há a possibilidade de ter havido o efeito sinérgico entre Celluclast 1.5L com as enzimas hidrolíticas do secretoma de *M. pulchella*. Por isso, serão necessárias maiores investigações sobre a validação da predição das enzimas AA9 do secretoma de *M. pulchella*, afim de compreender a ação dessas enzimas e entender em qual tipo de substrato elas são ativas (celulose ou celooligossacarídeos). Uma alternativa de estudo seria avaliar a formação de produtos oxidados nos ensaios de hidrólise, além de estudar quais os tipos de AA9 foram produzidos por *M. pulchella*, já que é sabido que existem 3 tipos de enzimas AA9 com mecanismos de ação diferenciados (LI et al., 2012).

5.4 Análise da região intergênica ITS de *M. pulchella*

A análise de sequências gênicas para o estudo da filogenia molecular constitui-se como uma ferramenta refinada para classificar e revalidar a taxonomia de microrganismos. As principais vantagens em se utilizar a filogenia molecular são: melhorar a compreensão da classificação baseada na morfologia e padronizar a classificação, através modelos matemáticos e testes estatísticos (JEANMOUGIN et al., 1998). Um estudo realizado pelos autores Morgenstern et al (2012), baseado na filogenia molecular, reportou a confirmação da taxonomia de diversos fungos termofílicos, incluindo espécies do fungo *M. cinnamomea*. Dentre as linhagens estudadas por eles, foi reportado que a espécie *M. cinnamomea* IFM 41309 se tratava de uma designação para a espécie *M. pulchella* CBS202.38, apesar de outros

autores alegarem que *M. cinnamomea* IFM 41309 seria uma designação para *M. cinnamomea* CBS343.55.

Nossa hipótese inicial é que o fungo em estudo, trata-se de uma espécie semelhante ao fungo *M. cinnamomea*. Para testar a semelhança e homologia entre essas espécies, foi realizado procedimento para obtenção e sequenciamento gênico do fragmento de ITS de *M. pulchella* linhagem 6278. A extração de DNAg resultou em amostra com concentração de DNA de 24,9 ng.µL⁻¹ e grau de pureza de 1,7. O DNAg extraído foi submetido à reação de PCR com os *primers* ITS5/ITS4. Foram realizadas reações em duplicata, variando a temperatura de anelamento entre 56 °C, 58 °C e 60 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) para análise da qualidade dos produtos de amplificação. Conforme observado na Figura 22, as bandas de nucleotídeos resultantes encontram-se alinhadas na região entre 500 – 750 bp e a amostra está ausente de produtos inespecíficos, demonstrando que a qualidade da reação de amplificação está adequada. O fragmento obtido mostrou tamanho compatível com a região ITS esperada (450-700 bp) (BELLEMAIN et al., 2010). As duplicatas de cada um dos produtos da amplificação foram unidas e purificadas.

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), mostrando o produto da amplificação com os *primers* ITS5/ITS4 realizado em duplicata, com teste de temperatura de anelamento 56, 58 e 60 °C, a partir do DNAg extraído

MM: Marcador de pares de bases (GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder)

1, 2, 3: amostras dos produtos de amplificação, utilizando diferentes temperaturas de anelamento testadas na reação de PCR: 56 °C, 58 °C e 60 °C, respectivamente.

Fonte: Arquivo próprio.

A Tabela 6 mostra a concentração e grau de pureza do DNA presente nas amostras purificadas. Os dados da tabela indicam maiores concentrações de DNA para as amostras 2 e 3, resultantes das reações de PCR com temperatura de anelamento de 58 °C e 60 °C,

indicando que a amplificação foi mais eficiente com a temperatura de anelamento nessa faixa. Todas as amostras apresentaram grau de pureza dentro da faixa de valores esperada, entre 1,7 – 2,0. Essa faixa indica que não há a presença de contaminantes como proteínas e RNAs, conforme desejável para sequenciamento.

As amostras foram enviadas para o sequenciamento gênico, etapa cuja realização foi executada em colaboração com a Dra. Juliana Velasco no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE – CNPEM, Campinas-SP), conforme protocolo interno. A sequência de bases de nucleotídeos resultante do sequenciamento foi lida através do programa Geneious. O resultado do sequenciamento Sanger das bases de nucleotídeos do fragmento ITS, qualidade dos cromatogramas das sequências *forward* e *reverse*, e alinhamento da sequência consenso encontram-se no material suplementar (apêndice E).

Tabela 6 - Concentração do DNA e grau de pureza obtido do produto de amplificação purificado, segundo produto de amplificação resultante da reação de PCR diferentes temperaturas de anelamento.

Amostra	Temperatura de anelamento (°C)	OD (260 nm)	OD (280 nm)	DNA (ng.µL ⁻¹)	Grau de pureza
1	56	0,0086	0,0044	8,6	1,95
2	58	0,0141	0,0078	14,1	1,81
3	60	0,013	0,0072	13	1,81

Fonte: Arquivo próprio.

Para a análise da sequência gênica consenso, foi realizada uma análise prévia de semelhança por meio da ferramenta *Nucleotide BLAST* (Blastn) do NCBI. O resultado da primeira busca mostrou alinhamento com nove sequências de regiões intergênicas semelhantes àquela sequenciada para *M. pulchella* linhagem 6278, apresentando identidades superiores a 90%, e e-value igual ou inferior a 4.10^{-72} , demonstrando alta semelhança e confiança entre as regiões alinhadas. Os principais alinhamentos foram com *M. cinnamomea* das seguintes linhagens CBS 343.55, GSMBKU e CM-10T, cuja cobertura de alinhamento foi superior a 85%.

Realizou-se, ainda, uma segunda busca através da mesma ferramenta do NCBI, desta vez contra todo o banco de dados da coleção de nucleotídeos do NCBI para validar os resultados da escolha inicial de filtrar por organismos na primeira busca. Ordenando a lista resposta por identidade, os resultados retornaram os primeiros nove alinhamentos significantes com identidade acima de 95%, sendo 4 dos alinhamentos já observados pela

busca anterior e o primeiro *hit* de identidade permanecendo com a linhagem *M. cinnamomea* CBS 343.55. Os demais alinhamentos, dentre os nove mais significantes, foram com 4 linhagens de “fungos não cultiváveis” e uma linhagem de *Malbranchea flava* MTCC 4887. Dentre os alinhamentos obtidos, foram selecionados apenas os fungos do gênero *Malbranchea* e a linhagem *M. cinnamomea* IFM 41309 mencionada por Morgenstern et al (2012) para análise de alinhamento e homologia através da inferência de uma árvore gênica de comparação. Os fungos selecionados para análise de homologia estão listados na Tabela 7. O alinhamento dessas sequências e a árvore filogenética construída estão representadas na Figura 23.

Figura 23 – Alinhamento global das sequências ITS das linhagens selecionadas pela busca Blastn (A) Árvore de inferência filogenética (B).

As sequências alinhadas contem nome e número de acessos do Genbank das linhagens na mesma ordem que a Tabela 7. O cromatograma com picos verdes mostram maior identidade entre as sequências e os vermelhos, menores identidades.

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 7 - Fungos utilizados para estudo de semelhança e homologia segundo alinhamento significativo com a sequência intergênica ITS de *M. pulchella*.

Microorganismo	Linhagem	GenBank	Tamanho (bp)	Autor/referência	Primers
<i>M. pulchella</i>	6278		582	Este estudo	ITS5/ITS4
<i>M. cinnamomea</i>	CBS 343.55	JF412018.2	511	Morgenstern et al (2012)	ITS1/ITS4
<i>M. cinnamomea</i>	GSMBKU	KT279416.1	711	Shanthipriya,A., Koteswara Rao,V., Girisham,S. and Madhusudhan	
<i>M. cinnamomea</i>	CM-10T	KJ563258.1	617	Mahajan et al. (2014)	
<i>M. cinnamomea</i>	CBS 960.72	JF922020.1	1380	Pettersson OV, Leong SL, Lantz H, Rice T, Dijksterhuis J, Houbraken J, Samson RA, Schnürer J.	
<i>M. pulchella</i>	IFM 41308 CBS 202.38	AB361638.1	618	Sano,A., Takayama,A., Yarita,K., Kamei,K. and Takahara,H	
<i>M. cinnamomea</i>	P4_F9_737	KU325186.1	460	Gomes,T., Pereira,J.A. and Baptista,P.	
<i>M. cinnamomea</i>	JH2J2-1	KP117272.1	529	Cao,D.	
<i>M. cinnamomea</i>	LH4 SH195293.07FU	KF703902.1	534	Huang,F. and Zhang,C.Y.	
<i>M. cinnamomea</i>	HSAUP0380003 SH195293.07FU	GU966515.1	573	Liang,Y. and Li,D.C.	ITS1/ITS4
<i>M. flava</i>	MTCC4887	EF550978.1	404	Chadha,B.S., Sharma,M.B. and Kaur,M.	ITS1/ITS4
<i>M. cinnamomea</i>	IFM 41309 CBS 343.55	AB359414.1	617	Sano,A., Takayama,A., Yarita,K., Kamei,K. and Takahara,H.	

Fonte: Arquivo próprio.

A partir da Figura 23A, foi possível observar que a sequência ITS do fungo *M. pulchella* alinhada com as sequências de outras linhagens apresenta maior padrão de identidade nas regiões de cerca de 200 – 500 bp e também entre 600 – 700 bp. Foi possível observar alta identidade entre o fungo em estudo e as linhagens de *M. cinnamoema* e uma linhagem de *M. flava*. As linhagens que apresentaram menor identidade com as demais sequências foram *M. cinnamoema* IFM 41309 e *M. cinnamomea* CBS 960.72. Devido ao maior número de alterações/substituições de nucleotídeos em relação as demais linhagens, essas espécies foram calculadas como as espécies com maior distância evolutiva na construção da árvore filogenética (Figura 23B). Os autores Morgenstern et al (2012) haviam reportado um conflito de informações de que *M. cinnamoema* IFM 41309 era um sinônimo de *M. pulchella* IFM 41308 e a linhagem *M. cinnamomea* CBS 960.72 era homólogo a *M. cinnamomea* CBS 343.55. Entretanto, essa afirmação não foi validada com a árvore inferida neste estudo.

Sobre o posicionamento de *M. pulchella* na árvore filogenética inferida, foi possível demonstrar proximidade evolutiva com outras linhagens também caracterizados como potenciais produtores de enzimas para degradação de biomassa, como *M. cinnamomea* CBS 343.55 e *M. cinnamomea* CM-10T. A árvore inferida neste estudo foi validada pela árvore de sequências gênicas ITS contendo outras espécies de fungos gerada por Mahajan et al. (2016), a qual demonstrou que *M. cinnamomea* CM-10T estava no mesmo clado que *M. cinnamomea* CBS 343.55 e *M. flava* MTCC4887. Um trabalho anterior de Mahajan et al. (2014) já havia demonstrado com uma árvore filogenética a linhagem prospectada por eles, *M. cinnamomea* CM-10T, e *M. cinnamomea* CBS 343.55 possuíam um ancestral em comum.

Portanto, validamos, assim, nossa hipótese, levando em consideração a semelhança, identidade e homologia entre o fungo em estudo e a linhagem *M. cinnamomea* CBS 343.55 de que essas linhagens são espécies relacionadas, obtendo uma forte indicação que *M. pulchella* 6278 é, na verdade, uma espécie *M. cinnamoema*. Assim, validando também os resultados do secretoma que foram construídos baseando-se na proteômica da linhagem *M. cinnamomea* CBS 343.55.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo analisar e caracterizar o secretoma produzido pelo fungo *M. pulchella*. Para estudá-lo foram escolhidas condições de indução por biomassa como fonte única de carbono. A polpa Kraft foi utilizada como modelo de biomassa “não-lignificada” e eucalipto, como modelo de biomassa lignificada, sendo glicose utilizada como uma condição de controle positivo. Dentro do contexto de prospecção de novas enzimas, foi realizado o estudo e caracterização das CAZymes produzidas nos secretomas das três condições de indução com ênfase na aplicação para a despolimerização de material lignocelulósico.

Devido a pouca informação existente na literatura sobre o fungo *M. pulchella*, foram estudadas desde condições de crescimento até a caracterização das enzimas produzidas. O trabalho percorreu algumas etapas para mostrar que o crescimento e a produção de enzimas são aspectos relacionados quando se analisa o secretoma. Inicialmente, encontrou-se condições adequadas de crescimento através da avaliação do efeito da temperatura e do pH. Foi demonstrado que o fungo *M. pulchella* se trata de uma espécie termofílica que apresenta crescimento ótimo na temperatura de 45 °C, sendo a mínima de crescimento a 27 °C, a máxima a 55 °C e a ótima para esporulação a 37 °C. Foi demonstrado que o fungo cresce em velocidades semelhantes para incubação a 37 °C e 45 °C em pH entre 6,0 e 7,5 e que possui crescimento lento, devido a fase *lag* levar em torno de 2 dias. Foi demonstrado também que o fungo possui potencial de crescimento em 18 tipos de fontes de carbono, dentre elas fontes solúveis, insolúveis e complexas.

Estabelecido os parâmetros adequados para crescimento, *M. pulchella* foi testado quanto a capacidade de biodegradação de material lignocelulósico *in vitro* por um período máximo de 60 dias. Foi demonstrado que o fungo é capaz de crescer e utilizar materiais lignocelulósicos como suporte e fonte de carbono, embora, em material lignocelulósico lignificado (eucalipto moído), tanto a capacidade de crescimento quanto de biodegradação sejam restritas. Os principais motivos identificados para a baixa degradação do eucalipto (cerca de 5% em perda em massa) foram devido à recalcitrância intrínseca do material lignocelulósico sem pré-tratamento e à baixa produção de enzimas lignolíticas, posteriormente confirmada por espectrometria de massas. Em material “não lignificado” (polpa Kraft branqueada), foi demonstrado que o fungo possui maquinário enzimático para biodegradar essencialmente polissacarídeos. Com a mineralização de hemicelulose e

celulose, foi atingido 52% de perda em massa. A partir desses aspectos, foi proposto que o fungo possui característica de degradação branda, como a maioria dos ascomicetos com capacidade de degradação de material lignocelulósico.

Através da análise dos extratos proteicos por espectrometria de massas, foi possível identificar uma diversidade de proteínas produzidas nas três condições de indução (polpa Kraft, eucalipto e glicose), somando um total de 181 proteínas identificadas. Os resultados obtidos demonstraram que o efeito de indução parece ser dependente da condição metabólica, da capacidade de despolimerização e mineralização do substrato, o que corrobora com o proposto por Delmas et al. (2012) sobre a produção de um coquetel hidrolítico restrito em condição de escassez de nutrientes e um coquetel hidrolítico mais completo a partir da despolimerização do material. Considerando os três secretomas estudados, um total de 62 CAZymes foram identificadas, sendo que 33 foram identificadas diferencialmente entre as condições de indução e 29 foram encontradas nas três condições. O secretoma produzido em polpa Kraft se mostrou potencial por apresentar uma maior quantidade de CAZymes e por conter um arsenal com as principais enzimas para degradação de substratos modelos de celulose e hemicelulose. Já, em relação a identificação de enzimas lignolíticas, foram identificadas poucas enzimas das famílias AA relacionadas a degradação de lignina, sendo que os fungos característicos por serem degradadores de madeira apresentam várias proteínas destas famílias. Por outro lado, foi identificado um número mais expressivo de enzimas oxidativas com ação em polissacarídeos.

Para a caracterização das CAZymes produzidas, foram escolhidas as principais famílias de celulasas, hemicelulasas e enzimas acessórias. Foi demonstrado que o secretoma com maiores níveis de atividade catálítica foi aquele produzido em polpa Kraft, seguido pelo secretoma produzido por eucalipto e, por último, aquele produzido em glicose. A caracterização das CAZymes contribuiu no entendimento e confirmação da estratégia para degradação de material lignocelulósico (degradação preferencial de polioses), sendo que as enzimas com maiores níveis de atividade enzimática encontradas foram as endo-xilanases, β -glicosidases e β -xilosidases. A avaliação do secretoma hidrolítico e oxidativo produzido em polpa Kraft branqueada demonstrou potencial para aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Ao demonstrar a capacidade hidrolítica do secretoma com alta carga de proteínas foi obtido conversão de glucana e xilana em torno de 40% e 70%, respectivamente. Já, em relação ao secretoma oxidativo, não foi possível demonstrar significativamente seu potencial, entretanto foi observado nos ensaios com Celluclast, suplementados com o

secretoma de *M. pulchella* (baixa carga) há expressiva melhora na conversão de glucana, tanto na hidrólise com polpa de dissolução (20% aumento de conversão) e com Avicel (8% aumento de conversão). Assim, demonstrando que o secretoma do fungo termofílico *M. pulchella* atua de forma sinérgica tanto na despolimerização de celulose amorfa, quanto cristalina.

A última conclusão do trabalho foi feita a partir da hipótese de que o fungo *M. pulchella* se trata de uma espécie sinônima de *M. cinnamomea*, devido à própria nomenclatura muito similar, às características morfológicas e a resposta quanto ao crescimento. Essa hipótese foi confirmada por meio análise de de semelhança e homologia entre sequências intergênicas (ITS). Uma alta similaridade entre as regiões ITS dessas duas espécies foi observada pela análise por Blastn e, a partir da árvore gênica filogenética, observou-se alta identidade entre as sequências e a homologia entre as linhagens *M. cinnamomea* CBS 343.55 e *M. pulchella* 6278, demonstrando que esses fungos são agrupados no mesmo clado e possuem ancestral em comum.

Por fim, é possível afirmar que os dados obtidos neste trabalho geram contribuições importantes dentro do contexto de prospecção de novas enzimas de fungos termofílicos. Em suma, com a análise e caracterização do secretoma de *M. pulchella*, foram identificadas oportunidades de depositar novas sequências de proteínas em banco de dados públicos e de contribuir no sequenciamento do genoma do fungo *M. pulchella*, ainda não publicado.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. et al. Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. **Current Genetics**, v. 47, n. 1, p. 49–56, 18 jan. 2005.
- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores De Florestas Plantadas. **Anuário estatístico ABRAF 2013 ano base 2012**. Brasília. Disponível em: <<http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-ABRAF13-BR.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2017.
- AGUILAR-PONTES, M. V.; DE VRIES, R. P.; ZHOU, M. (Post-)Genomics approaches in fungal research. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 424–439, 1 nov. 2014.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of THE CELL**. 5 ed. ed. Garland Sciencece, 2008. v. 1
- ALWANI, M. S. et al. Agricultural biomass raw materials: the current state and future potentialities. In: HAKEEM, K. R.; JAWAID, M.; RASHID, U. (Eds.). **Biomass and Bioenergy**. Cham: Springer International Publishing, 2014. v. 15p. 77–100.
- ANDRADE, M. F.; COLODETTE, J. L. Dissolving pulp production from sugar cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 58–64, jan. 2014.
- ARAGÃO, A. Z. B. et al. Novel processed form of syndecan-1 shed from SCC-9 cells plays a role in cell migration. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43521, 15 ago. 2012.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.
- BAKER, S. E. et al. **PNNL Fungal biotechnology core DOE-OBP project**. Disponível em: <papers3://publication/uuid/DA79D76A-3293-4F89-9E3E-645ECF8A70D3>. Acesso em: 15 out. 2015.
- BANERJEE, S.; ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Xylose metabolism in a thermophilic mould *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* TMD-8. **Current Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 349–352, dez. 1994.
- BELLEMAIN, E. et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 189, 2010.
- BERKA, R. M. et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922–927, 2011.
- BHADAURIA, V. et al. Advances in fungal proteomics. **Microbiological Research**, v. 162, n. 3, p. 193–200, jul. 2007.
- BHUVANESWARI UDAYA PRAKASH, S.; GEETHA, S.; UDAYA PRAKASH, N. K. Optimization studies on a thermophilous fungus , *Malbranchea pulchella* var . *sulfurea* on Lipase Synthesis. **Journal of Applied Biology**, v. 2, n. 2, p. 54–57, 2011.
- BISSARO, B. et al. Fenton-type chemistry by a copper enzyme: molecular mechanism of polysaccharide oxidative cleavage. **bioRxiv**, n. December, p. 1–14, 2016.

BLUMER-SCHUETTE, S. E. et al. Thermophilic lignocellulose deconstruction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 3, p. 393–448, maio 2014.

BORIN, G. P. et al. Comparative Secretome Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129275, 8 jun. 2015.

BROTMAN, Y. et al. Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 779–789, 11 abr. 2008.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Ethanol from sugarcane in Brazil: a “midway” strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **GCB Bioenergy**, v. 4, n. 2, p. 119–126, mar. 2012.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. Routes for cellulosic ethanol in Brazil. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Sugarcane Bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2014. v. 1p. 365–380.

BUSK, P.; LANGE, L. Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 47, 2013.

CAZy - Carbohydrate Active enZYme. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

CLUTTERBUCK, A. J. Sexual and parasexual genetics of *Aspergillus* species. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 23, p. 3–18, jan. 1992.

DAVISON, B. H. et al. Plant cell walls: basics of structure, chemistry, accessibility and the influence on conversion. In: **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 23–38.

DELMAS, S. et al. Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 8, p. e1002875, 9 ago. 2012.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–8, set. 2012.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology**. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co, 2009. v. 1

ERICKSON, B.; NELSON; WINTERS, P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 2, p. 176–85, 2012.

ERIKSSON, K.-E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990.

FEIST, P.; HUMMON, A. B. Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 3537–63, 5 fev. 2015.

FERRAZ, A. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201–212, set. 2000.

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: AZEVEDO, E. E. & J. L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 215–242.

FERRAZ, A.; CÓRDOVA, A. M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 59–65, jan. 2003.

FITZPATRICK, M. et al. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 8915–22, dez. 2010.

FUSTIER, P. et al. Effect of inoculation techniques and relative humidity on the growth of molds on the surfaces of yellow layer cakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 192–6, jan. 1998.

GHATAK, H. R. Biorefineries from the perspective of sustainability: feedstocks, products, and processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 8, p. 4042–4052, out. 2011.

GLASS, N. L. et al. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual review of microbiology**, v. 67, n. 1, p. 477–98, 8 set. 2013.

GREENBAUM, D. et al. Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function. **Genome Research**, v. 11, n. 9, p. 1463, 2001.

GREENBAUM, D.; JANSEN, R.; GERSTEIN, M. Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 18, n. 4, p. 585–96, 1 abr. 2002.

GRIGORIEV, I. V. et al. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D699–704, jan. 2014.

GUERRIERO, G. et al. Deconstructing plant biomass: focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. **Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology**, v. 234, p. 180–93, maio 2015.

GUERRIERO, G.; SERGEANT, K.; HAUSMAN, J.-F. Wood biosynthesis and typologies: a molecular rhapsody. **Tree Physiology**, p. 1–17, 2014.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 474–480, dez. 2006.

GYGI, S. P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 3, p. 1720–30, mar. 1999.

HAN, P. et al. A novel multifunctional α -amylase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*: biochemical characterization and three-dimensional structure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 2, p. 420–35, 29 maio 2013.

HEMSWORTH, G. R. et al. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 122–6, 22 fev. 2014.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **The Biochemical Journal**, v. 280 (Pt 2, n. 1, p. 309–16, 1 dez. 1991.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 637–44, out. 1997.

HEUX, S. et al. White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1653–1670, dez. 2015.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 9 fev. 2007.

HORI, C. et al. Temporal alterations in the secretome of the selective ligninolytic fungus *ceriporiopsis subvermispora* during growth on aspen wood reveal this organism's strategy for degrading lignocellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2062–2070, 1 abr. 2014.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2 jul. 2012.

JAIN, M. K.; KAPOOR, K. K.; MISHRA, M. M. Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin, and humus formation by thermophilic fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 73, n. 1, p. 85–89, ago. 1979.

JEANMOUGIN, F. et al. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 10, p. 403–405, 1998.

JIANG, L.; HE, L.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. **Journal of Chromatography. A**, v. 1023, n. 2, p. 317–20, 16 jan. 2004.

JOHRI, B. N.; SATYANARAYANA, T.; OLSEN, J. **Thermophilic Moulds in Biotechnology**. Springer Science & Business Media, 1999.

JONKER, J. G. G. et al. Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**, v. 147, p. 593–610, jun. 2015.

KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. **Biorefineries: Industrial Processes and Products**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137–145, 1 abr. 2004.

KEARSE, M. et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 15 jun. 2012.

KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. Proteomics of filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 395–400, set. 2007.

KING, D. **The Future of Biorefineries**. Disponível em: <http://www3.weforum.org/docs/WEF_FutureIndustrialBiorefineries_Report_2010.pdf>. Acesso em: 15 out. 2015.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: RAYMOND A. YOUNG, MASOOD AKHTAR (Ed.). **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: p. 273–307.

KNUDSEN, G. M.; CHALKLEY, R. J. The effect of using an inappropriate protein database for proteomic data analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 21 mar. 2013.

LI, X. et al. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. **Structure**, v. 20, n. 6, p. 1051–1061, 2012.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D490–D495, jan. 2014.

LYND, L. R. et al. How biotech can transform biofuels. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169–72, fev. 2008.

MADAN, M.; THIND, K. S. **Physiology of Fungi**. New Delhi: A.P,H Publishing Corporation, 1998.

MAHAJAN, C. et al. Evaluation of glycosyl hydrolases from thermophilic fungi for their potential in bioconversion of alkali and biologically treated Parthenium hysterophorus weed and rice straw into ethanol. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 300–307, 2014.

MAHAJAN, C. et al. Malbranchea cinnamomea: a thermophilic fungal source of catalytically efficient lignocellulolytic glycosyl hydrolases and metal dependent enzymes. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 55–63, jan. 2016.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 461–488, 2000.

MAIJALA, P. et al. Characterization of hemicellulases from thermophilic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 4, p. 905–17, 28 maio 2012.

MÄKELÄ, M. R.; DONOFRIO, N.; DE VRIES, R. P. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, n. SEPTEMBER, p. 2–9, nov. 2014.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Outlook**, v. 70, p. 437–473, 2001.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195–204, set. 2005.

MATSUO, M.; YASUI, T. Properties of xylanase of Malbranchea pulchella var. sulfurea No. 48. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 839–841, 9 mar. 1985.

MATSUO, M.; YASUI, T.; KOBAYASHI, T. Enzymatic properties of b-xylosidase from malbranchea pulchella var. sulfurea No. 48. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 9, p. 1601–1606, 1977a.

MATSUO, M.; YASUI, T.; KOBAYASHI, T. Purification and some properties of β -xylosidase from *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No. 48. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 9, p. 1593–1599, 9 set. 1977b.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, ago. 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.

MORGENSTERN, I. et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**, v. 116, n. 4, p. 489–502, abr. 2012.

MORRISON, K. B.; RIGHELATO, R. C. The relationship between hyphal branching, specific growth rate and colony radial growth rate in *Penicillium chrysogenum*. **Journal of General Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 517–20, 1 abr. 1974.

MURPHY, C. et al. Curation of characterized glycoside hydrolases of Fungal origin. **Database**, v. 2011, p. 1-14, 26 maio 2011.

NESVIZHSKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646–58, 1 set. 2003.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 659–664, 25 jun. 2009.

OLASON, P. I. Integrating protein annotation resources through the distributed annotation system. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server, p. W468–W470, 1 jul. 2005.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–448, 11 fev. 2015.

PHILLIPS, C. M. et al. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 12, p. 1399–1406, 16 dez. 2011.

PIRT, S. J. Estimation of substrate affinities (K_s values) of filamentous fungi from colony growth rates. **Journal of General Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 245–247, 1 mar. 1973.

PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. Solutions for preparing resolving gels for tris-glycine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 1, p. pdb.tab11, jun. 2006.

QIAN, J. et al. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 3, p. 439–449, 2008.

QING, Q.; WYMAN, C. E. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 18, 2011.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **World Fuel Ethanol Production**. Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

- RIBEIRO, D. A. et al. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. 1–9, 5 dez. 2012.
- RIBEIRO, L. et al. Screening of filamentous fungi for xylanases and cellulases not inhibited by xylose and glucose. **British Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 30–39, 2014a.
- RIBEIRO, L. F. et al. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 115, 2014b.
- RILEY, R. et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9923–9928, 8 jul. 2014.
- ROSENBERG, S. L. Temperature and pH optima for 21 species of thermophilic and thermotolerant fungi. **Can. J. Microbiol.**, v. 21, n. 5, p. 1535–1540, 1975.
- SAYKHEDKAR, S. et al. A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 52, 26 jul. 2012.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2 jun. 2010.
- SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 17 abr. 2012.
- SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 100–106, 2012.
- SEGATO, F. et al. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588–613, 26 dez. 2014.
- SHAPIRO, A. L.; VIÑUELA, E.; V. MAIZEL, J. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28, n. 5, p. 815–820, 7 set. 1967.
- SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, jan. 1996.
- SHOREIT, A.; ISMAIL, M.; MOHAMED, N. Preliminary study on soil microbiota degrading plant latices and their protease and lipase enzymes. **J Basic Appl Mycol (Egypt)**, v. 4, p. 33–45, 2013.
- SHRESTHA, B. et al. Observations on some of the mycelial growth and pigmentation characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. **Mycobiology**, v. 34, n. 2, p. 83–91, jun. 2006.
- SIBTHORP, C. et al. Transcriptome analysis of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* directed to the global identification of promoters. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 847, 3 dez. 2013.
- SINGH, B. et al. Thermophilic molds: biology and applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 985–1006, 17 nov. 2016.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. AUG, p. 1–16, 2015.

SMITH, B. Y. J. H. On the early growth rate of the individual fungus hypha. **The New Phytologist**, v. XXIII, n. 2, p. 65–78, 1924.

STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 801–804, 9 fev. 2007.

TRINCI, A. P. J. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. **Journal of General Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 325–344, 1 ago. 1971.

TSIRIGOS, K. D. et al. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W401–W407, 2015.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 9, 2007.

UNICA - União Da Indústria De Cana-De-Açúcar. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

VALADARES, F. et al. Exploring glycoside hydrolases and accessory proteins from wood decay fungi to enhance sugarcane bagasse saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 110, 23 dez. 2016.

VOORDOUW, G.; ROCHE, R. S. The role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. II. Studies on thermolysin, the thermostable protease from *Bacillus thermoproteolyticus*. **Biochemistry**, v. 14, n. 21, p. 4667–73, 21 out. 1975.

WANG, Q.; CEN, Z.; ZHAO, J. The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: an angle of omics. **Physiology**, v. 30, n. 2, p. 97–106, 1 mar. 2015.

WASMUTH, E. V.; LIMA, C. D. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158–D169, 4 jan. 2017.

WEBER, S. S. et al. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52470, 18 dez. 2012.

WINGER, A. M. et al. Secretome analysis of the thermophilic xylanase hyper-producer *Thermomyces lanuginosus* SSBP cultivated on corn cobs. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 11, p. 1687–96, 16 nov. 2014.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153–157, 2007.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-based carboxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 342, n. 1, p. 176–178, 1 jul. 2005.

YANG, S. et al. Purification and characterization of a novel alkaline β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1487–95, 12 out. 2014.

YIN, Y. et al. DbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. 445–451, 2012.

YU, X. et al. Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 1, p. S93–S98, jan. 2016.

ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, set. 2006.

ZHAO, Z. et al. Correction: Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. **BMC genomics**, v. 15, p. 6, 3 jan. 2014.

ANEXO A – Composição das soluções de sais, elementos traços e vitaminas utilizadas nos cultivos

SOLUÇÃO DE SAIS (Clutterbuck Salt Solution 20x) (CLUTTERBUCK, 1992)

Valores de massa apresentados com base em solução final de 1000 mL.

Sais	% (p/v)
NaNO ₃	12
KCl	1,04
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,04
KH ₂ PO ₄	3,04

SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS (1000x)

Valores apresentados com base em solução final de 1000 mL.

Sais	% (p/v)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2
H ₃ BO ₃	1,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5
CoCl ₂ .5H ₂ O	0,16
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16
Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,11
Na ₂ EDTA	5

MIX DE VITAMINAS (1000x)

10 mg de cada vitamina do kit de vitaminas (Sigma–Aldrich V-1) em 1000 mL.

APÊNDICE A – Detalhamento dos carboidratos em termos de origem, composição de açúcares, ligação glicosídica da cadeia principal e fabricante.

Carboidratos	Material de origem	Composição de açúcares (%)	Ligação glicosídica (cadeia principal)	Fabricante
Ácido poligalactourônico (p-pgact)	Pectina de citrus	GalUA 96 : Outros 4	α -1,4 GalUA	Megazyme
Arabinana	Beterraba (<i>sugar beet</i>)	Ara 69 : Gal 18,7 : GalUA 10,2 : Outros 2,1	α -1,5 Ara	Megazyme
Arabinana não ramificação (p-dbar)	Beterraba (<i>sugar beet</i>)	Ara 88 : Gal 4 : GalUA 6 : Ra 2	α -1,5 Ara	Megazyme
Arabinogalactana (p-argal)	Lariço (<i>larch wood</i>)	Gal 81: Ara 14 : Outros 5	β -1,3 Gal	Megazyme
Arabinoxilana (p-waxy)	Farinha de aveia (<i>wheat</i>)	Xil 62 : Ara 38 : Outros 3	β -1,4 Xil	Megazyme
Arabinoxilana	Farinha de centeio (<i>rye</i>)	Xil 62 : Ara 38 : Outros 3	β -1,4 Xil	Megazyme
Avicel (PH-101 ~ 50 μ m tamanho de partícula)		> 97% celulose microcristalina	β -1,4 Gli	Sigma
Carboximetilcelulose (CMC)			β -1,4 Gli	Sigma
Galactomanana (p-galml)	Alfarrobeira (<i>carob</i>)	Man 78 : Gal 22 (> 94% pureza)	β -1,4 Man	Megazyme
Galactomanana (<i>locust bean gum</i> , G-0753)	Sementes de alfarrobeira (<i>seeds of carob tree</i>)	Man 75 : Gal 25 (~ 80% pureza)	β -1,4 Man	Sigma
Glicose		Pureza analítica (PA)	-	Synth
β -glucana (p-bgbl)	Cevada (<i>barley</i>)	> 97% resíduos de glicose	β -1,4 Gli / β -1,3 Gli	Megazyme
Liquenana	Musgo da Islândia (<i>Icelandic moss</i>)	> 80% resíduos de glicose	β -1,4 Gli / β -1,3 Gli	Megazyme
Manana		Man 98 : Gal 1	β -1,4 Man	Megazyme
Quitosana		$\geq$ 75 % desacetilada	β -1,4 Glicosamina	Sigma
Xilana	Faia (<i>beechwood</i>)	Xil 81,3 : GalUA 13 : Outros 5,7	β -1,4 Xil	Megazyme
Xilana	Betula (<i>birchwood</i>)	~ 85% xilana	β -1,4 Xil	Megazyme
Xilana	Lariço (<i>larch wood</i>)	80-85% xilana	β -1,4 Xil	Sigma
Xiloglucana (p-xygln)	Semente de tamarindo (<i>tamarind seed</i>)	Gli 45 : Xil 34 : Gal 18 : Ara 3	β -1,4 Gli	Megazyme
p-nitrofenol- α -L-arabinofuranosideo (pNPA)			α -1,5 Ara	Sigma
p-nitrofenol- β -D-glicopiranosideo (pNPG)			β -1,4 Gli	Sigma
p-nitrofenol- β -D-xilopiranosideo (pNPX)			β -1,4 Xil	Sigma

Ara – Arabinose, Gal – Galactose, GalUA – Ácido poligalactourônico, Gli – Glicose, Ra – Ramnose, Xil – Xilose

APÊNDICE B – Composição química dos materiais

Composição química de polpa Kraft *in natura* e dos resíduos sólidos resultantes da biodegradação de polpa Kraft com *M. pulchella* durante período de 7, 14, 21 e 60 dias.

DIAS DE TRATAMENTO	AMOSTRA	TEORES DE COMPOENTES					SOMA
		Lignina total	Lignina solúvel	Lignina insolúvel	Glucana	Xilana	
0	POLPA IN NATURA 1	1,5%	0,7%	0,7%	76,9%	14,1%	92,5%
0	POLPA IN NATURA 2	1,3%	0,6%	0,7%	75,3%	13,8%	90,5%
0	POLPA IN NATURA 3	1,7%	0,6%	1,1%	75,2%	13,9%	90,8%
21	CONTROLE 1	4,2%	0,6%	3,6%	74,9%	13,4%	92,5%
21	CONTROLE 2	5,6%	0,6%	5,0%	75,2%	13,1%	93,9%
21	CONTROLE 3	4,1%	0,6%	3,5%	76,0%	13,3%	93,3%
7	BIODEGRADADO 1	1,7%	0,7%	1,0%	79,3%	12,2%	93,2%
7	BIODEGRADADO 2	1,4%	0,4%	1,0%	77,7%	12,2%	91,4%
7	BIODEGRADADO 3	2,5%	0,5%	2,0%	78,4%	12,7%	93,6%
14	BIODEGRADADO 1	5,3%	0,6%	4,7%	80,1%	9,2%	94,6%
14	BIODEGRADADO 2	3,7%	0,6%	3,1%	80,2%	9,3%	93,2%
14	BIODEGRADADO 3	4,2%	0,6%	3,7%	78,7%	9,1%	92,1%
21	BIODEGRADADO 1	4,8%	0,7%	4,1%	79,4%	8,9%	93,1%
21	BIODEGRADADO 2	5,8%	0,7%	5,1%	77,7%	8,9%	92,4%
21	BIODEGRADADO 3	3,5%	0,7%	2,8%	79,6%	8,9%	92,0%
60	BIODEGRADADO 1	5,6%	1,2%	4,4%	74,3%	8,2%	88,1%
60	BIODEGRADADO 2	5,9%	1,4%	4,5%	71,7%	7,5%	85,1%
60	BIODEGRADADO 3	5,8%	1,2%	4,6%	74,9%	8,1%	88,7%

Teores de extrativos não descontados desses valores.

Composição química do eucalipto moído *in natura* e dos resíduos sólidos resultante da biodegradação de eucalipto moído e lavado com etanol 95% com *M. pulchella* durante período de 7, 14, 21 e 60 dias.

DIAS DE TRATAMENTO	AMOSTRA	TEORES DE COMPOENTES						SOMA
		Lignina total	Lignina solúvel	Lignina insolúvel	Glucana	Xilana	Extrativos	
0	EUCA IN NATURA 1*	28,3%	3,5%	24,8%	45,1%	12,8%	3,3%	86,1%
0	EUCA IN NATURA 2*	28,2%	3,5%	24,7%	45,5%	13,1%	3,2%	86,8%
0	EUCA IN NATURA 3*	28,5%	3,6%	24,9%	45,3%	12,8%	3,3%	86,6%
21	CONTROLE 1	25,8%	4,2%	21,6%	44,5%	12,5%	-	82,8%
21	CONTROLE 2	25,7%	3,8%	21,9%	44,5%	12,4%	-	82,6%
21	CONTROLE 3	26,1%	3,9%	22,1%	45,0%	12,7%	-	83,7%
7	BIODEGRADADO 1	27,5%	2,4%	25,1%	45,6%	12,8%	-	85,9%
7	BIODEGRADADO 2	27,3%	2,5%	24,9%	46,1%	12,8%	-	86,3%
7	BIODEGRADADO 3	26,8%	2,3%	24,5%	46,0%	12,9%	-	85,7%
14	BIODEGRADADO 1	27,0%	2,2%	24,8%	45,8%	12,8%	-	85,6%
14	BIODEGRADADO 2	27,4%	3,1%	24,3%	43,7%	12,6%	-	83,7%
14	BIODEGRADADO 3	27,5%	2,5%	25,0%	45,9%	12,9%	-	86,3%
21	BIODEGRADADO 1	29,6%	3,5%	26,1%	46,5%	13,4%	-	89,5%
21	BIODEGRADADO 2	29,1%	3,0%	26,2%	46,1%	13,4%	-	88,5%
21	BIODEGRADADO 3	29,4%	2,9%	26,4%	46,1%	12,7%	-	88,2%
60	BIODEGRADADO 1	28,2%	3,2%	25,0%	42,9%	12,3%	-	83,4%
60	BIODEGRADADO 2	28,9%	3,6%	25,3%	39,4%	11,0%	-	79,4%

*Teores de componentes e soma final da composição química, descontando o teor de extrativos.

APÊNDICE C – Secretoma

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
1	Malci1p7_000683	antigenic cell wall protein	XP_002622680	Proteína de ligação					26,2	3,66	S	N	N	EC
2	Malci1p7_001223	Proteína hipotética	KLJ09412	Oxidoreductase					49,9	7,12	N	N	N	LMP ou MT
3	Malci1p7_016583	Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase	E9CXX8	CAZyme	GH47				56,0	4,82	S	N	S	LMP ou EC
4	Malci1p7_016944	hydrolase	GAQ35223	CAZyme	GH2				66,2	5,40	S	N	N	EC
5	Malci1p7_007221	chitinase 1	KMM73157	CAZyme	GH18				57,1	6,65	N	N	N	LMP ou EC
6	Malci1p7_005553	alpha-mannosidase	KEY78584	CAZyme	GH38				124,1	6,16	N	N	N	RE
7	Malci1p7_008903	NADP-specific glutamate dehydrogenase	KLJ08767	Oxidoreductase					50,4	6,01	N	N	N	CT
8	Malci1p7_011021	Glycoside hydrolase family 2	CRL17989	CAZyme	GH2				96,3	4,81	S	N	N	LMP ou EC
9	Malci1p7_015606	glycoside hydrolase family 10 protein	XP_003664565	CAZyme	GH10				33,5	4,89	S	N	N	LMP ou EC
10	Malci1p7_005753	Cu, Zn Superóxido dismutase	GAM36556	Superóxido dismutase					16,1	5,64	N	N	N	CT
11	Malci1p7_004184	42 kDa endochitinase-like protein	OAL51012	CAZyme	GH18				41,6	4,96	S	N	N	CT
12	Malci1p7_000508	Proteína hipotética	XP_001239831	CAZyme	GH125				57,7	5,22	S	N	N	LMP ou RE
13	Malci1p7_011890	conserved Proteína hipotética	EFW14969	Proteína de ligação					46,8	4,66	N	N	N	LMP ou MT

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
14	Malci1p7_009242	cellobiose dehydrogenase	XP_001822302	CAZyme	AA8				82,3	4,55	S	N	N	LMP ou EC
15	Malci1p7_016597	IgE-Proteína de ligação	XP_731512	Proteína hipotética					20,4	5,17	S	N	N	LMP ou MT
16	Malci1p7_007526	Fe-Mn family Superóxido dismutase	KKZ60830	Superóxido dismutase					25,5	8,89	N	Potencial	N	LMP ou MT
17	Malci1p7_003444	cellulose 1,4-beta-cellobiosidase	CAM98447	CAZyme	GH7				47,9	4,12	S	N	N	LMP ou EC
18	Malci1p7_007716	endoglucanase	XP_748715	CAZyme	AA11				20,8	4,52	S	N	N	LMP ou EC
19	Malci1p7_016127	1,3-beta-glucanosyltransferase Bgt1	XP_001264620	CAZyme	Putativa GH17				31,0	5,04	S	N	N	CT
20	Malci1p7_015916	Cell wall protein PhiA	XP_014534957	Proteína hipotética					18,8	5,15	S	Potencial	N	LMP ou EC
21	Malci1p7_008147	alpha/beta-glucosidase	EGE80601	CAZyme	GH31				97,9	5,04	S	N	N	LMP ou EC
22	Malci1p7_010796	1,3-beta-glucanosyltransferase gel3	EIT79202	CAZyme	GH72	Putativa CBM43			58,8	4,46	N	N	S	MP
23	Malci1p7_007981	carboxypeptidase 2	ENH86361	Protease peptidase					58,5	4,80	S	N	N	LMP ou EC
24	Malci1p7_001220	antigenic cell wall protein	XP_002622680	Proteína de ligação					30,4	3,86	S	N	N	EC
25	Malci1p7_010278	L-galactose dehydrogenase	GAQ46812	Oxidoreductase					50,5	4,93	N	N	N	LMP ou MT

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

118

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
26	Malci1p7_014691	Glycoside hydrolase-type carbohydrate-binding, subgroup	KXG46510	CAZyme	Putativa GH				42,3	4,70	S	N	N	MP
27	Malci1p7_016212	exo-beta-1,3-glucanase	EGC44210	CAZyme	GH55	GH55			90,5	4,59	S	N	N	MP
28	Malci1p7_001544	glycoside hydrolase 6	CDF76449	CAZyme	GH6				35,5	4,42	S	Potencial	N	EC
29	Malci1p7_000109	beta-glucosidase A	XP_003068430	CAZyme	GH3				89,5	4,69	S	N	N	LMP ou EC
30	Malci1p7_003637	cytochrome c peroxidase	KMM68971	CAZyme	AA2				41,4	8,73	N	Potencial	N	LMP ou MT
31	Malci1p7_002531	beta-1,4-xylanase	ACS26244	CAZyme	GH11				22,7	5,57	S	N	N	EC
32	Malci1p7_008268	endo-1,3-beta-glucanase	XP_001388743	CAZyme	GH81				78,9	5,66	N	N	N	LMP ou EC
33	Malci1p7_003611	aminopeptidase	KEY80790	Protease peptidase					109,5	6,18	N	N	N	LMP ou EC
34	Malci1p7_010158	cell wall glucanase	GAQ42064	CAZyme	Putativa GH16				43,5	4,37	S	N	N	MP
35	Malci1p7_008715	GDSL Lipase/Acylhydrolase	EGD93615	CAZyme	Putativa CE12				29,4	5,71	N	N	N	CT
36	Malci1p7_014109	Secreted beta-glucosidase sun1	XP_748964	CAZyme	GH132				42,8	4,76	S	N	N	EC
37	Malci1p7_009794	glycosyl hydrolase	EEH03458	CAZyme	GH65				116,3	4,71	S	N	N	MP
38	Malci1p7_018168	FAD dependent Oxidoreductase	XP_746776	CAZyme	AA7	AA7			52,6	5,83	S	N	N	LMP ou EC
39	Malci1p7_016414	Proteína hipotética	EHA23795	Protease peptidase					82,8	5,75	N	N	N	CT
40	Malci1p7_016942	Chain A, Structure Of An Alpha-amylase From Malbranchea Cinnamomea	VM7_A	CAZyme	GH13				51,9	4,42	S	N	N	LMP ou EC

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
41	Malci1p7_001838	carbohydrate esterase family 16 protein	XP_007687628	CAZyme	CE16				34,0	4,22	S	N	N	LMP ou EC
42	Malci1p7_006484	aminopeptidase, Putativa	KMK59190	Protease peptidase					98,4	5,79	N	N	N	LMP ou EC
43	Malci1p7_011878	Putativa glycoside hydrolase family 61 protein	KKY19971	CAZyme	AA9				23,3	5,13	S	N	N	EC
44	Malci1p7_008884	Chain A, Humicola Insolens Endocellulase Egi Native Structure	2A39_A	CAZyme	GH7				43,7	5,02	S	N	N	LMP ou EC
45	Malci1p7_008250	riboNuclease T2, Putativa	EDP56875	Proteína de ligação					26,6	4,31	S	Potencial	N	EC
46	Malci1p7_017863	endoglucanase, Putativa	XP_001267236	CAZyme	AA9				23,2	5,15	S	N	N	EC
47	Malci1p7_017401	beta-glucosidase 1B	GAQ44092	CAZyme	GH1				54,7	5,26	N	N	N	LMP ou PS
48	Malci1p7_013782	Chain A, C. Immitis Chitinase	1D2K_A	CAZyme	GH18				45,8	4,85	S	N	N	EC
49	Malci1p7_009724	GPI anchored serine-threonine rich protein	EDP55707	Proteína hipotética					22,0	4,23	S	N	N	EC
50	Malci1p7_011594	Putativa Citrate Sintase	CEJ59591	Sintase					51,7	8,65	N	Potencial	N	LMP ou MT
51	Malci1p7_005231	aminopeptidase	EEQ88518	Protease peptidase					51,8	4,89	S	Potencial	N	LMP ou EC

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

120

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
52	Malci1p7_009058	alkaline Fosfatase	XP_009155605	Fosfatase					33,3	4,77	S	N	N	LMP ou MT
53	Malci1p7_008920	Chain A, Glucuronoyl Esterase Catalytic Domain (Cip2_ge)	3PIC_A	CAZyme	CE15				26,5	4,89	N	Potencial	N	LMP ou EC
54	Malci1p7_010505	glycoside hydrolase	EER38105	CAZyme	GH20				83,5	4,60	S	N	N	MP
55	Malci1p7_006373	repressible alkaline Fosfatase	ADC84228	Fosfatase					66,9	5,67	N	N	S	MP
56	Malci1p7_006370	cell wall glucanase	EFW17139	CAZyme	Putativa GH16	Putativa CBM18			45,5	4,29	S	N	N	MP
57	Malci1p7_006185	dihydrolipoyl dehydrogenase	OAX79661	Oxidoredutase					55,5	8,58	N	N	N	LMP ou MT
58	Malci1p7_008755	endoNuclease G, MT	KLJ11170	Nuclease					37,1	9,10	N	Potencial	S	LMP ou MT
59	Malci1p7_006766	ubiquitin	EAA29567	Proteína de ligação					34,5	6,94	N	N	N	CT
60	Malci1p7_001759	glycolipid-anchored surface protein 5	XP_002540773	CAZyme	GH72				46,6	4,78	S	N	S	MP
61	Malci1p7_014506	carboxypeptidase A1	XP_959049	Protease peptidase					44,8	4,82	S	N	N	LMP ou EC
62	Malci1p7_016595	2-methylcitrate Dehidratase, Putativa	XP_001257579	Liase					60,9	8,62	N	Potencial	N	LMP ou MT
63	Malci1p7_004494	Proteína hipotética	KFY38326	Protease peptidase					28,4	4,84	N	N	N	EC
64	Malci1p7_009964	T-cell reactive protein	JC4215	Oxidoredutase					45,2	5,68	N	N	N	NUC
65	Malci1p7_010469	Proteína hipotética	EGE06603	Oxidoredutase					28,9	5,67	S	N	N	LMP ou CP
66	Malci1p7_017137	carbohydrate-binding domain, family 9-like	OAQ71679	CAZyme	Putativa CBM9				24,0	5,02	S	N	N	LMP ou EC
67	Malci1p7_004493	conserved Proteína hipotética	EGC49271	Proteína hipotética					26,3	4,40	S	N	N	LMP ou EC

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
68	Malci1p7_007187	vacuolar protease A	GAQ04331	Protease peptidase					41,8	4,73	S	N	N	LMP ou EC
69	Malci1p7_014327	conserved Proteína hipotética	XP_002583884	Protease peptidase					71,5	5,00	S	S	N	LMP ou EC
70	Malci1p7_012724	glucose-6-phosphate isomerase	EDP54506	Isomerase					61,0	6,29	N	N	N	CT
71	Malci1p7_001714	membrane dipeptidase	XP_002849071	Protease peptidase					46,7	5,94	N	N	S	MP
72	Malci1p7_000593	Glycoside hydrolase, family 71	KGO73075	CAZyme	GH71				51,8	4,53	S	N	N	LMP ou EC
73	Malci1p7_001766	Glycosyl hydrolase 31	XP_013330292	CAZyme	GH31				76,3	6,01	N	N	N	CT
74	Malci1p7_011859	copper radical oxidase	EFW13530	CAZyme	AA5				97,4	4,17	S	N	N	LMP ou EC
75	Malci1p7_003055	endo-beta-1,4- xylanase GH10	AIG99409	CAZyme	GH10	Putativa CBM1			40,7	4,56	S	N	N	LMP ou EC
76	Malci1p7_006733	aspartate aminotransferase	EFW21573	Transferase					46,7	9,08	N	Potencial	N	LMP ou MT
77	Malci1p7_004350	WSC domain- containing protein	EGE09392	Proteína hipotética					52,2	4,71	S	N	N	LMP ou EC
78	Malci1p7_008649	Malonate- semialdehyde dehydrogenase	XP_013328007	Oxidoreductase					62,3	8,05	N	Potencial	N	LMP ou MT
79	Malci1p7_017741	Fasciclin domain family	EDP56667	Proteína de ligação					50,9	6,31	N	N	N	MT

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

122

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
80	Malci1p7_009461	Putativa secreted protein	XP_007289050	Proteína hipotética					20,9	4,57	S	N	N	EC
81	Malci1p7_001702	copper amine oxidase, Putativa	XP_003066723	Oxidoreductase					74,9	6,53	N	N	N	PS
82	Malci1p7_002738	ornithine carbamoyltransferase	KMM73418	Transferase					39,0	6,36	N	N	N	LMP ou MT
83	Malci1p7_004446	Lumazine Sintase	OCK98646	Sintase					23,6	6,16	N	N	N	LMP ou MT
84	Malci1p7_013990	fumarylacetoacetate hydrolase family protein	XP_001270833	Fumaril acetoacetase					26,0	8,46	N	N	N	CT
85	Malci1p7_002503	Alpha-1,2-mannosidase, Putativa	CDM33199	CAZyme	GH92				92,2	5,54	S	N	N	LMP ou EC
86	Malci1p7_001765	agmatinase, Putativa	XP_003066749	Ureohidrolase					40,1	5,48	S	N	N	LMP ou MT
87	Malci1p7_011908	chitinase	DAA05856	CAZyme	GH18	Putativa CBM50	Putativa CBM50	Putativa CBM18	153,2	4,53	S	N	N	MP
88	Malci1p7_015791	allergen Pen n 13	AF193420_1	Protease peptidase					39,6	5,64	S	N	N	LMP ou EC
89	Malci1p7_015505	cupin domain protein	KOC09200	Proteína de ligação					14,9	4,91	N	N	N	CT
90	Malci1p7_003715	predicted protein	XP_006968333	Fosfolipase					15,8	5,15	S	Potencial	N	EC
91	Malci1p7_001555	glycoside hydrolase family 61 protein, partial	XP_014079914	CAZyme	AA9				18,8	4,19	N	N	N	EC
92	Malci1p7_006944	carbohydrate esterase family 4 protein	XP_003654730	CAZyme	Putativa CE4				24,2	4,80	N	N	N	LMP ou EC
93	Malci1p7_014876	CS antigen	XP_003065978	Proteína fitotóxica					14,3	4,61	S	N	N	LMP ou EC
94	Malci1p7_000910	beta-glucosidase 5	XP_003070577	CAZyme	Putativa GH17				53,4	4,73	S	N	N	LMP ou EC

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
95	Malci1p7_017772	dipeptidyl-peptidase 3	XP_003177819	Protease peptidase					87,5	6,02	N	N	N	CT
96	Malci1p7_003591	mycelial catalase Cat1	KEY75630	Catalase					77,8	5,35	S	N	N	LMP ou EC
97	Malci1p7_005747	cerevisin	EQ89129	Protease peptidase					51,6	5,65	S	N	N	LMP ou EC
98	Malci1p7_006836	calnexin, Putativa	CBF75819	Proteína de ligação					59,6	4,74	S	N	S	LMP ou RE
99	Malci1p7_004445	Putativa proteasome subunit alpha type-7	KZN90000	Protease peptidase					31,4	5,17	N	N	N	MP
100	Malci1p7_006931	Proteína hipotética	KKZ64146	Proteína hipotética					18,8	5,15	S	N	N	EC
101	Malci1p7_000475	Cyanase	XP_013324462	Liase					18,0	5,90	N	N	N	LMP ou PS
102	Malci1p7_002318	BYS1 domain protein, Putativa	EDP51049	Proteína específica de fase de levedura					15,0	4,36	S	N	N	EC
103	Malci1p7_011375	FAD binding domain protein	GAQ33161	CAZyme	AA7				58,2	5,44	S	N	N	LMP ou MT
104	Malci1p7_015894	4-hydroxy-2-oxo- heptane-1,7-dioate aldolase	GAO88873	Quinase					27,5	6,08	N	Potencial	N	LMP ou MT
105	Malci1p7_004677	Proteína hipotética	KMM70296	Proteína hipotética					38,0	5,61	S	N	S	MP
106	Malci1p7_013525	cytochrome c oxidase subunit V	EDP51797	Oxidoreductase					21,1	9,75	N	N	N	LMP ou MT

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

124

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
107	Malci1p7_001985	ribose 5-phosphate isomerase A	GAQ41988	Isomerase					28,7	5,33	N	N	N	CT
108	Malci1p7_004294	conserved Proteína hipotética	EFW22613	CAZyme	AA7				56,4	5,15	S	N	N	MP
109	Malci1p7_002425	Putativa Lactoylglutathione Liase	CEN59885	Liase					41,9	6,52	N	N	N	MT
110	Malci1p7_012880	glutaminase A	EGC43502	Proteína hipotética					95,9	5,21	S	N	N	MP
111	Malci1p7_001966	FAD binding domain-containing protein	KZL64493	CAZyme	AA7	AA7			61,3	5,56	S	Potencial	N	LMP ou LS
112	Malci1p7_004514	Proteína hipotética	OAG06631	Proteína hipotética					23,7	4,80	S	Potencial	N	EC
113	Malci1p7_006725	iron donor protein	OAX81231	Oxidoreductase					25,7	5,33	N	Potencial	N	LMP ou MT
114	Malci1p7_000530	endoNuclease/exoNuclease/Fosfatase family protein	XP_002382463	Fosfatase					34,8	6,87	N	N	N	PS
115	Malci1p7_008746	Endoglucanase	1GZJ_A	CAZyme	Putativa GH5				26,8	4,09	N	N	N	LMP ou EC
116	Malci1p7_010221	endoglucanase	XP_748715	CAZyme	AA11				20,0	5,92	N	N	N	LMP ou EC
117	Malci1p7_008917	Proteína hipotética	XP_002851205	Proteína hipotética					29,6	4,37	S	N	N	EC
118	Malci1p7_005751	transaldolase	GAQ39555	Transaldolase					35,7	5,68	N	N	N	CT
119	Malci1p7_007327	gamma-glutamyltranspeptidase	GAQ46869	Protease peptidase					66,3	5,75	N	N	S	MP
120	Malci1p7_005657	proteasome component Pup3, Putativa	GAD96386	Protease peptidase					22,6	5,18	N	N	N	CT

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
121	Malci1p7_003713	stress responsive A/B barrel domain-containing protein	EGD96567	Proteína resposta ao stress					12,1	5,89	N	N	N	MT
122	Malci1p7_000388	FAD dependent Oxidoreductase	XP_746776	CAZyme	AA7				52,5	4,98	S	N	N	CT
123	Malci1p7_004332	Putativa Cytochrome c oxidase polypeptide VI, MT	CEN60420	Oxidoreductase					17,7	5,59	N	Potencial	N	MT
124	Malci1p7_016418	flavohemoprotein	XP_015401370	Oxidoreductase					49,5	6,98	N	N	N	LMP ou MT
125	Malci1p7_017005	Peptidase M28	KGO70993	Protease peptidase					38,7	4,94	S	N	N	EC
126	Malci1p7_015182	membrane copper amine oxidase	XP_002795516	Oxidoreductase					87,4	4,94	S	N	N	LMP ou EC
127	Malci1p7_010901	Proteína hipotética	CEL05029	Glioxalase					18,8	5,86	N	N	N	LMP ou PS
128	Malci1p7_009969	Fumarilacetoacetase	GAQ42113	Fumaril acetoacetase					46,7	5,83	N	N	N	CT
129	Malci1p7_009516	cholinesterase	GAQ46438	CAZyme	Putativa CE10				74,8	4,72	S	N	N	MP
130	Malci1p7_009878	fatty acid Sintase alpha subunit FasAFasA, Putativa	EDP53207	Sintase					205,4	6,01	N	N	N	MP
131	Malci1p7_011682	mmfI	EAA30687	Nuclease					13,8	5,76	N	N	N	MT

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

126

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
132	Malci1p7_016173	Proteína hipotética FOXG_16730	KNB19455	Proteína hipotética					19,1	4,89	S	N	N	EC
133	Malci1p7_002536	isocitrate Liase	KMP02001	Liase					60,8	6,39	N	N	N	LMP ou PS
134	Malci1p7_005208	aspartyl aminopeptidase	KOC08391	Protease peptidase					54,5	6,00	N	S	N	CT
135	Malci1p7_008694	agmatinase	XP_002621415	Ureohidrolase					42,3	5,36	S	N	N	CT
136	Malci1p7_003106	proteasome component PRE6	KLJ09478	Protease peptidase					29,1	8,31	N	N	N	MP
137	Malci1p7_009512	nucleoside diphosphate Kinase	XP_001393898	Quinase					16,9	6,96	N	N	N	LMP ou MT
138	Malci1p7_004626	fructose-1,6- bisFosfatase Fbp1	GAQ37945	Fosfatase					39,2	5,92	N	N	N	CT
139	Malci1p7_003540	lysoFosfolipase	EQL32530	Fosfolipase					67,1	4,32	S	N	N	MP
140	Malci1p7_010999	proteasome component Pre3, Putativa	KMK56063	Protease peptidase					25,3	5,39	N	N	N	MP
141	Malci1p7_000178	ADP,ATP Proteína transportadora	XP_001244490	Proteína transportadora					34,5	9,86	N	N	S	LMP ou MT
142	Malci1p7_013795	Proteína hipotética	XP_010756245	Proteína hipotética					16,2	7,82	S	N	S	LMP ou CP
143	Malci1p7_016591	Putativa beta- glucosidase	EPS28539	CAZyme	GH3				103,8	5,34	N	N	S	MP
144	Malci1p7_003109	aldehyde reductase 1	GAQ37596	Oxidoreductase					35,9	6,48	N	N	N	CT
145	Malci1p7_010212	Putativa hydrolases or acyltransferase	IT73293	Protease peptidase					50,9	6,53	N	N	N	LMP ou MT
146	Malci1p7_010838	aconitate hydratase	GAQ45266	Aconitase					85,8	6,68	N	Potencial	N	LMP ou MT
147	Malci1p7_015002	glycoside hydrolase family 18 protein	XP_003664710	CAZyme	GH18	Putativa CBM50	Putativa CBM50	Putativa CBM18	151,6	4,82	S	N	N	MP

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
148	Malci1p7_002904	proteasome component PRE2	KKZ68178	Protease peptidase					31,1	5,65	N	N	N	LMP ou MT
149	Malci1p7_013568	citrate Sintase	GAQ43907	Sintase					52,2	8,42	N	N	N	LMP ou PS
150	Malci1p7_012628	extracellular phytase	XP_754221	Fosfatase					72,3	5,25	S	N	N	LMP ou EC
151	Malci1p7_014154	Profilin II, Putativa	XP_003070680	Proteína de ligação					14,1	5,25	N	N	N	CT
152	Malci1p7_007026	alpha-glucuronidase	AFN44902	CAZyme	GH67				91,7	5,96	S	N	N	LMP ou EC
153	Malci1p7_001198	Adenylosuccinate synthetase	KGO74056	Sintase					46,5	6,29	N	N	N	CT
154	Malci1p7_001444	hydrophobic surface Proteína de ligação B	XP_003173933	Proteína de ligação					18,0	4,62	S	N	N	LMP ou EC
155	Malci1p7_004383	aromatic amino acid aminotransferase	EIT79835	Transferase					69,0	6,09	N	Potencial	N	CT
156	Malci1p7_010649	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate Sintase	XP_001212524	Sintase					26,0	4,91	N	N	N	MT
157	Malci1p7_015318	fructose-bisphosphate aldolase	KKP07492	Sintase					39,8	5,70	N	N	N	CT
158	Malci1p7_005641	20S proteasome, regulatory subunit beta type	EIT78408	Protease peptidase					20,6	6,30	N	N	N	LMP ou MT
159	Malci1p7_010914	Allergen V5	KGO77739	Proteína rica em cisteína					36,5	4,40	S	N	N	EC

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(continuação)

128

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
160	Malci1p7_013746	alpha-1,2-mannosidase	GAQ47651	CAZyme	GH92				85,8	4,95	N	N	N	LMP ou RE
161	Malci1p7_017631	beta-glucosidase	GAQ45485	CAZyme	GH3				82,1	4,69	S	N	N	LMP ou EC
162	Malci1p7_013501	proteasome subunit alpha type-2	GAQ39791	Protease peptidase					30,1	5,91	N	N	N	MT
163	Malci1p7_007217	20S proteasome subunit alpha 1	KKZ62561	Protease peptidase					28,0	6,84	N	N	N	MP
164	Malci1p7_004673	imidazoleglycerol-phosphate Dehidratase	GAT30719	Dehidratase					26,4	6,04	N	N	N	LMP ou MT
165	Malci1p7_008244	beta-N-acetylhexosaminidase	KKZ63573	CAZyme	GH20				66,9	5,59	S	N	N	MP
166	Malci1p7_005404	dipeptidyl peptidase 4	KKZ67755	Protease peptidase					85,0	5,16	S	N	N	LMP ou EC
167	Malci1p7_010255	endochitinase 1	XP_001401833	CAZyme	GH18	Putativa CBM50			55,8	5,84	N	N	N	LMP ou EC
168	Malci1p7_000371	endo-beta-1,4-endoglucanase A	XP_001940574	CAZyme	GH12				24,5	4,08	S	N	N	LMP ou EC
169	Malci1p7_006236	Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/CLD	KJK68405	Isomerase					18,9	8,48	N	N	N	NUC
170	Malci1p7_009098	aspartyl aminopeptidase	EGE81997	Protease peptidase					56,0	6,03	N	N	N	CT
171	Malci1p7_014462	rho GDP-dissociation inhibitor	GAQ44381	Inibidor rho GDP - dissociação					22,3	5,35	N	N	N	CT
172	Malci1p7_011978	hsp72-like protein	OAP64629	Proteína de ligação					70,6	5,13	N	N	N	CT
173	Malci1p7_015305	Elongation factor 2, Putativa	XP_003071324	Proteína de ligação					94,0	6,49	N	N	N	CT
174	Malci1p7_016894	N transport factor NTF-2, Putativa	XP_002374735	Proteína transportadora					14,0	4,54	N	N	N	NUC

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

(continua)

(conclusão)

#	Número de acesso	Descrição	Número de acesso	Anotação de função	Domínio CAZy				MM	pI	Localização celular			
	Genoma <i>M. cinnamomea</i>	NCBI	NCBI		DOM 1	DOM 2	DOM 3	DOM 4	(kDa)		Peptídeo sinal	Secreção não clássica	Proteína TM	Via de secreção
175	Malci1p7_009751	cytochrome c subunit Vb	EDP53961	Oxidoredutase					21,3	5,48	N	Potencial	N	MT
176	Malci1p7_012685	hsp7-like protein	XP_001244995	Proteína de ligação					72,8	6,18	N	S	N	LMP ou RE
177	Malci1p7_011963	coproporphyrinogen III oxidase	XP_002790127	Oxidoredutase					50,3	8,10	N	N	N	CT
178	Malci1p7_011802	proteasome component	XP_750785	Protease peptidase					27,8	5,60	N	N	N	NUC
179	Malci1p7_013672	actin	KMK55120	Actina					41,7	5,54	N	N	N	NUC
180	Malci1p7_007074	Peptidase S9, prolyl oligopeptidase, catalytic domain	CDM32495	Protease peptidase					79,3	6,00	N	N	N	LMP ou EC
181	Malci1p7_014484	thioredoxin	EEH22651	Oxidoredutase					12,6	5,10	N	N	N	MT

S – Sim, N – Não, MM – Massa molecular, TM – Transmembrana, CG – Complexo de golgi, CT – Citoplasmática, EC – Extracelular (Secretada), LMP – Ligada à Membrana plasmática, LS – Lisossomal, MT – Mitochondrial, MP – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PS – Peroxissomal, RE – Retículo endoplasmático

APÊNDICE D – Cinética enzimática

Sequência intergênica no sentido *foward* (ITS 6)

Sequência consenso (*assembly*)

A sequência de nucleotídeos coloridos evidencia a sequência consenso (*assembly* entre a sequência *forward* ITS6 e *reverse* ITS4). A coloração da linha abaixo da sequência consenso indica a identidade entre as sequências no *assembly*, linha vermelha representa menor identidade e linha verde indica maior identidade entre as sequências.

```

Consensus      TTTACCGTGGCCATCGGGGACGGCTCCGGCGGGGCCCTCCCGGCCACCCGTGT
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... TKGTTACTGCGGAGGWCATTACCGTGCCATCGGGGACGGCTCCGGCGGGGCCCTCCCGGCCACCCGTGT
ITS4_B07_Seq_16.09.16....      TTKRARWWAAACGACAGTTCAAGACCTGGGARGACATCKSCWYG
Consensus      CTACCGAACCACGTTGCCTCGGGGGCCCCGGGATCGCCCCGGGGGACCGCCGGGGGCTCGCC
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... CTACCGAACCACGTTGCCTCGGGGGCCCCGGTCCCCGGGATCGCCCCGGGGGACCGCCGGGGGCTCGCC
ITS4_B07_Seq_16.09.16.... GGMGSSTCGSGGCCCTCCGCMCKTTACGACAGTCCCGSGGCCCTCCCGGGATSCCCGGGACCC
Consensus      GGGGCCCTGTGTCGCGACGGCCCCGGGCCGCGCCCGCCGAGGAGTTCGACCGAACCTCTGTGATCC
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... GGGGCCCTGTGTCGCGACGGCCCCGGGCCGCGCCCGCCGAGGAGTTCGACCGAACCTCTGTGATCC
ITS4_B07_Seq_16.09.16.... CCGGGTGTGCGSSCTGTGCGCGAGGCCCGGGCCCGCGCGCGCGAGAGTTCGACCGAACCTCTGTGATCC
Consensus      GTGAGCGAGTCTGAGTCGACTGGAAAAATCGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGA
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... GTGAGCGAGTCTGAGTCGACTGGAAAAATCGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGA
ITS4_B07_Seq_16.09.16.... GTGAGCGAGTYTGTGAGTCGACTGGAAAAATCGTCAAA-CTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCGCATCGA
Consensus      TGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... TGAAGAACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
ITS4_B07_Seq_16.09.16.... TGAAGA-CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
Consensus      CACATGGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTGCACCTTCAGCGCCGCTTGT
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... CACATGGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTGCACCTTCAGCGCCGCTTGT
ITS4_B07_Seq_16.09.16.... CACATGGCGCCCTCTGGTATTCCGGGGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTGCACCTTCAGCGCCGCTTGT
Consensus      GTGATGGCGCGCGTCCCCGAAGTGGGCGACGGCCGAAAGGCAGKCGSGTCCCGTCACTCTCGAT
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... GTGATGGCGCGCGTCCCCGAAGTGGGCGACGGCCGAAAGGCAGTGGCGGGCGTCTCGGGTCTCAT
ITS4_B07_Seq_16.09.16.... GTGATGGCGCGCGTCCCCGAAGTGGGCGACGGCCGAAAGGCAGTGGCGGGCGTCTCGGGTCTCAT
Consensus      CSCCGAGTGCATGGCTCAGTACGMCAGCSAGGACGSSCGGCGACCCCGGATMCCCGTGTGTGCTC
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... CSCCGAGTGCATGGCTCAGTACGMCAGCSAGGACGSSCGGCGACCCCGGATMCCCGTGTGTGCTC
ITS4_B07_Seq_16.09.16.... CCTCGATCGCCCGAGTGCATGGGGCTCAGTACGACGACGAGGACCGGCGCGGCGGCGGACCCCGCG
Consensus      ACACCCCGTGTGTGCTCTCGACGGTGACCTCGGATCAGGTAGGTCCA
ITS6_C07_Seq_16.09.16.... TTCRCGGTGAATCGATCAGTAGGATACCGCTGACTAASWTCTAAGGMRRARR
ITS4_B07_Seq_16.09.16.... ACACCCCGTGTGTGCTCTCGACGGTGACCTCGGATCAGGTAGGTCCA

```

From Genomes to Transcriptomes and Secretomes: A Fungal Perspective with Insights into Biorefinery Applications

Carlaile F.O. Nogueira¹, Gabriela L. Berto¹, Gustavo H. Goldman², Rolf A. Prade³ and Fernando Segato^{1,*}

¹*Department of Biotechnology, Escola de Engenharia de Lorena, University of São Paulo, Lorena, SP, Brazil;* ²*Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil and* ³*Department of Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA*

Abstract: The post-genomic sequencing stimulated all sorts of biological sequencing strategies such as genomic DNA sequencing, mRNA-Seq, LC-MS/MS peptide counting and metabolomics enabling the establishment of complex and interactive networks made out of genes, proteins and metabolites. High-throughput methodologies analyze multiple metabolic pathways simultaneously offering benefits in the exploitation of new biorefining processes. However, it is evident that a single approach cannot unravel or solve the complexities of fundamental microbial biology by just making the integration of multiple information layers. Therefore, efforts have been made to systematically analyze the correlation between transcriptomic and proteomic datasets, improving the chances of capturing gene protein relationships as well as integration of novel biological processes. Here, we describe high-throughput genomics and proteomics tools, discuss the associated challenges and analyze fungal secretomes.

Keywords: Biofuels, biomass, enzymatic hydrolysis, filamentous fungi, genome, next-generation sequence, transcriptome, RNA-Seq, proteome, secretome.

1. INTRODUCTION

Currently, the Earth is confronting global-wide problems associated with fossil fuel depletion, climate change and biosphere degradation due to greenhouse gas emissions. Added to these factors, the present crisis in the energy scenario has promoted the research interest in renewable and less polluting fuels and chemicals. According to some estimates, the reserves of primary energy and raw materials especially oil will remain until 2050 due to population growth and

*Corresponding author **Fernando Segato:** Department of Biotechnology, Escola de Engenharia de Lorena, University of São Paulo, Lorena, SP, Brazil; Tel/Fax: +55 12 3159 5000; E-mail: segato@usp.br