UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANGELA DA SILVA MACHADO

**Estudo de glicosil hidrolases das famílias 6 e 7 provenientes de
basidiomicetos**

Lorena
2019

ANGELA DA SILVA MACHADO

**Estudo de glicosil hidrolases das famílias 6 e 7 provenientes de
basidiomicetos**

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferraz

Versão corrigida

Lorena
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

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

Machado, Angela da Silva

Estudo de glicosil hidrolases das famílias 6 e 7
provenientes de basidiomicetos / Angela da Silva
Machado; orientador André Luis Ferraz - Versão
Corrigida. - Lorena, 2019.
143 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Basidiomicetos. 2. Hidrólise enzimática. 3.
Secretoma. 4. Lc ms/ms. 5. Celobiohidrolases. I.
Título. II. Ferraz, André Luis, orient.

*Dedico esse trabalho ao meu pai Antenor, que me incentivou a
buscar o melhor de mim através da educação.*

*E a todos que me apoiaram e fizeram ser possível eu seguir
trilhando esse caminho.*

AGRADECIMENTOS

Um grande agradecimento ao meu orientador, André Ferraz, por toda dedicação, paciência e ensinamentos ao longo desses anos de pós-graduação. E aos professores Fernando Segato, Tatiane Franca, Adriane Milagres e Elisson Romanel, pelo auxílio ao longo deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Antenor e Ivani, pelo amor e apoio incondicional às minhas decisões. E a minha família buscapé, pelo amor e incentivo. Franci, Felipe, Tia Josi, Vic, Lelê e Cláudia, amo muito vocês! Em especial, meu sobrinho Miguel que chegou na minha vida para mostrar um amor imensurável e a minha companheira canina cheia de amor, Lila.

Todo mundo tem o amigo que merece, mas eu tenho os melhores. Um super obrigada aos meus melhores amigos que fizeram esse caminho ser mais cheio de amor, cumplicidade, alegrias e festas. Fernanda, Isabela, Lucas e Elder, o que vocês significam para mim não tem como simplificar em um pequeno agradecimento como este. Vocês são para sempre!

As minhas amigas de rep Nati, Midori, Tami, Jana, Carol e Stela, pelos maravilhosos momentos amizade que passamos. E por todo apoio nas piores horas dessa caminhada. E a todas as minhas Joaninhas queridas, que me acolheram tão bem e transformaram a nossa “rep” em um doce lar.

Aos meus amigos do laboratório Ciências da Madeira: Guilherme e Raphael, por serem os ICs mais companheiros que se pode desejar. Ao Thales e Gabi, que mesmo fora são sempre parte do grupo. Aos meus mais recentes paparazzis, Ottinho, Ana Maria, Flavinha e minha irmã do sul, Uira, por terem sido maravilhosos nessa reta final de doc. E em especial, a minha amiga Fernanda Valadares, que é parte fundamental dessa trajetória, dentro e fora do lab.

Aos técnicos/amigos indispensáveis, Zé Moreira, por toda a ajuda, ensinamentos e por sempre me ajudar a enxergar o lado bom das coisas. E ao Zé Cobrinha, pela ajuda, amizade e pelas informações. Esses dois são gente boa, vou sentir uma falta enorme deles.

Aos meus colegas do DEBIQ pelo companheirismo e auxílio e a todos meus caroneiros, o que vocês fazem pelos outros é algo simplesmente incrível. Obrigada pela paciência e pela disposição.

Aos meus colegas de muay thai, que mesmo recente na vida foram de extrema importância na conclusão desse projeto.

Aos meus amigos da BIO/UFRGS, que mesmo de longe sempre me acompanharam e me fizeram sentir que nem a distância muda a nossa grande amizade. A nossa conexão é inexplicável! Em especial, ao meu negrinho Rafa que viverá para sempre no meu coração!

À Escola de Engenharia de Lorena e ao Departamento de Biotecnologia por fazer possível minha participação no programa de Biotecnologia Industrial.

Por fim a CAPES pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada a todos!

“It was a long, difficult road. Thank God we finally got here.”

RESUMO

MACHADO, A. S. **Estudo de glicosil hidrolases das famílias 6 e 7 provenientes de basidiomicetos.** 2019. 143p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Devido a sua importante atividade celulolítica, basidiomicetos possuem um grande potencial de aplicação na hidrólise da biomassa. Fungos de podridão branca possuem um arsenal completo e robusto de enzimas envolvidas na degradação de todos os componentes da biomassa lignocelulósica. A hidrólise da celulose é um passo crucial na utilização da biomassa celulósica e é geralmente o gargalo no processo bioquímico. As celobiohidrolases (CBH) são as principais enzimas celulolíticas presentes em coquetéis enzimáticos comerciais. A CBH hidrolisa celulose cristalina a unidades solúveis de celobiose, o que a torna uma enzima chave para a produção de açúcares fermentáveis a partir da biomassa. Apesar do enorme potencial biotecnológico, a informação a respeito de celobiohidrolases de basidiomicetos é escassa quando comparada a enzimas de ascomicetos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a potencialidade de celobiohidrolases (GH6 e GH7) de dois fungos de podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*. Para produção de extratos enzimáticos ricos em celobiohidrolases foram feitos cultivos agitados dos fungos em meio basal utilizando avicel com fonte de carbono. Esses extratos serviram para identificação das proteínas produzidas por análise de secretômica por LC – MS/MS, aplicação em ensaios de hidrólise enzimática de medula de cana-de-açúcar, bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e bagaço pré-tratado com ácido diluído, e para purificação de uma celobiohidrolase de *P. chrysosporium* (PcCel7D), que foi avaliada na sacarificação de substratos lignocelulósicos. Foram identificadas 56 e 58 proteínas nos extratos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* cultivados por 12 dias em avicel, respectivamente. O resultado da secretômica dos extratos mostrou uma predominância na produção de enzimas envolvidas na degradação de carboidratos, em especial de glicosil hidrolases (GHs), 29 GHs de *P. chrysosporium* e 32 de *T. versicolor*. As celobiohidrolases das famílias GH7 e GH6 representaram cerca de 41 % e 36 % da abundância entre as GHs de *P. chrysosporium* e de *T. versicolor*, respectivamente. O extrato de *P. chrysosporium*, com suplementação de β -glicosidase, atingiu os valores obtidos com o extrato comercial Cellic® CTec2 na conversão da glucana da medula de cana-de-açúcar do híbrido H89 (80 % em 72 horas de reação). Já o extrato de *T. versicolor* proporcionou um percentual de 70 % de conversão de glucana nesse substrato. Os bagaços pré-tratados foram mais recalcitrantes a ação das enzimas dos extratos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor*, do que observado para Cellic® CTec2. As hidrólises enzimáticas com PcCel7D mostraram conversão de glucana semelhante a CBH de *Trichoderma* sp. em medula do H89 e bagaço sulfito alcalino (60 % e 30 %, respectivamente), mas apresentou conversão menor em bagaço ácido e avicel. Este é o primeiro trabalho que explora o potencial de sacarificação de extratos enzimáticos destes dois fungos sobre substratos lignocelulósicos.

Palavras chaves: Basidiomicetos. Hidrólise enzimática. Secretoma. LC MS/MS. Celobiohidrolases.

ABSTRACT

MACHADO, A. S. **Study of glycosyl hydrolases from families 6 and 7 from basidiomycetes**. 2019. 143p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2019.

Due to their important cellulolytic activity, basidiomycetes have a great potential of application lignocellulosic biomass hydrolysis. White rot fungi possess a complete and robust arsenal of enzymes involved in the degradation of all components of the lignocellulosic biomass. The hydrolysis of cellulose is a crucial step in the use of cellulosic biomass and is generally the bottleneck in the biochemical process. Cellobiohydrolases (CBH) are the main cellulolytic enzymes present in commercial enzyme cocktails. CBH hydrolyses crystalline cellulose to soluble units of cellobiose, which makes it a key enzyme to produce fermentable sugars from biomass. Despite the enormous biotechnological potential, the information about basidiomycete cellobiohydrolases is scarce when compared to ascomycetes enzymes. In this context, the objective of this work was to study the potentiality of cellobiohydrolases (GH6 and GH7) of two white rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. To produce enzymatic extracts rich in cellobiohydrolases, stirring cultures of fungi were made in basal medium using avicel with carbon source. These extracts were used to identify the proteins produced in the cultures (by LC - MS / MS analysis), applied in enzymatic hydrolysis tests of sugarcane pith, sugarcane bagasse pre - treated with alkaline sulfite and pre - treated with dilute acid, and for purification of a cellobiohydrolase from *P. chrysosporium* (PcCel7D), which was evaluated in the saccharification of lignocellulosic substrates. 56 and 58 proteins were identified in extracts of *P. chrysosporium* and *T. versicolor* cultivated for 12 days in avicel, respectively. The extracts showed a predominance of enzymes involved in the degradation of carbohydrates, especially glycosyl hydrolases (GHs), 29 GHs of *P. chrysosporium* and 32 of *T. versicolor*. The cellobiohydrolases of the GH7 and GH6 families accounted for approximately 41% and 36% of the abundance between the GHs of *P. chrysosporium* and *T. versicolor*, respectively. The extract of *P. chrysosporium*, with β -glucosidase supplementation, reached the values obtained with the commercial extract Cellic® CTec2 in the conversion of glucan of sugarcane pith of hybrid H89 (80% in 72 hours of reaction). The extract of *T. versicolor* provided 70% glucan conversion in this substrate. The pre-treated sugarcane bagasses were more recalcitrant to the action of the enzymes from *P. chrysosporium* and *T. versicolor*, than observed for Cellic® CTec2. Enzymatic hydrolysis with PcCel7D showed conversion of glucan similar to CBH of *Trichoderma* sp. in H89 pith and alkaline sulphite bagasse (60% and 30%, respectively), but presented lower conversion in acidic bagasse and avicel. This is the first work that explores the potential of saccharification from the enzymatic extracts produced by these two fungi on lignocellulosic substrates.

Keywords: Basidiomycetes. Enzymatic hydrolysis. Secretome. LC MS/MS.

Cellobiohydrolases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de uma porção da cadeia de celulose.....	19
Figura 2 - Esquema de degradação da celulose a partir da ação das enzimas endo-1,4-β-D-glucanase (EG), celobiohidrolases (CBHI e CBHII), 1,4-β-Dglucosidase (BGL), celobiose desidrogenase (CDH) e monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO1, 2 e 3).....	25
Figura 3 – Mecanismo de retenção na ação catalítica das celobiohidrolases I.....	26
Figura 4 - Mecanismo de inversão na ação catalítica das celobiohidrolases II.....	27
Figura 5 - Representação do domínio catalítico em forma de túnel de uma celobiohidrolase II de <i>T. reesei</i> (código PDB 1BVW)	28
Figura 6.- Representação esquemática do domínio catalítico da CBHI de <i>T. reesei</i> com um celooligômero ligado aos <i>subsites</i> -7 a +2.....	29
Figura 7 - Complexo catalítico ativo de <i>T. reesei</i> CBHI (GH7) sobre a celulose.....	30

(Figuras do Capítulo 1)

Figura 1.1 - Gel de proteínas (SDS-PAGE) dos extratos concentrados dos cultivos de <i>P. chrysosporium</i> em avicel.....	48
Figura 1.2 – Quantificação relativa (QR) da expressão gênica de celobiohidrolases de <i>P. chrysosporium</i> ao longo do tempo de cultivo em avicel.....	49
Figura 1.3 - Gel de proteínas (SDS-PAGE) dos extratos concentrados dos cultivos de <i>T. versicolor</i> em avicel.....	50
Figura 1.4 Quantificação relativa (QR) da expressão gênica de celobiohidrolases de <i>P. chrysosporium</i> ao longo do tempo de cultivo em avicel.....	51
Figura 1.5 - Quantidade de proteínas detectadas no extrato de <i>P. chrysosporium</i> cultivado em celulose microcristalina separadas por suas funções biológicas.....	55
Figura 1.6 - Distribuição da abundância relativa de cada grupo biológico de proteínas detectadas nos cultivos de <i>P. chrysosporium</i>	56
Figura 1.7 – Abundância relativa de cada família CAZy detectada no extrato de <i>P. chrysosporium</i>	57
Figura 1.8 - Diversidade e quantidade de proteínas de grupo encontrados no extrato de <i>T. versicolor</i> cultivado em celulose microcristalina.....	61
Figura 1.9 - Distribuição da abundância relativa de cada grupo biológico de proteínas detectadas nos cultivos de <i>T. versicolor</i>	62
Figura 1.10 – Abundância relativa de cada família CAZy detectada no extrato de <i>T. versicolor</i>	64

(Figuras do Capítulo 2)

Figura 2.1. – Cinéticas de conversão de glucana (I, II, e III) e xilana (IV, V, VI), utilizando extratos enzimáticos de <i>P. chrysosporium</i> sem suplementação e com suplementação de β-glicosidases, extrato comercial Cellic® Ctec2 e extrato comercial Novozyme 188.....	80
Figura 2.2.- Cinéticas de conversão de glucana (I, II, e III) e xilana (IV, V, VI), utilizando extratos enzimáticos de <i>T. versicolor</i> sem suplementação e com suplementação de β-glicosidases, extrato comercial Cellic® Ctec2 e extrato comercial Novozyme 188.....	84

Figura 2. 3 – Conversão de glucana (em 72 h) em relação ao enriquecimento de glucana nos três substratos entres todos os ensaios de hidrólise enzimática.....86

(Figuras do Capítulo 3)

Figura 3.1 –Atividade de celobiohidrolase e perfil de proteína em eletroforese SDS-PAGE (12 %) das frações após a primeira etapa de cromatografia iônica DEAE-Sepharose de bancada ao longo do perfil de eluição com NaCl 1M.98

Figura 3.2 – Atividade de celobiohidrolase e perfil de proteína em eletroforese SDS PAGE (12 %) das frações após a segunda etapa de cromatografia iônica DEAE-Sepharose de bancada ao longo do perfil de eluição com NaCl 1M.....99

Figura 3.3 – Cromatograma da fração zero na coluna de troca iônica HiPrep DEAE FF acoplada ao sistema ÄKTA™ FPLC™ ao longo da eluição com NaCl 1M. Indicado no Cromatograma o número da amostra selecionada para análise em SDS-PAGE.....100

Figura 3.4 - Análise de proteínas em eletroforese SDS-PAGE (12 %) em 9 alíquotas do terceiro pico encontrado na cromatografia de troca iônica em coluna HiPrep DEAE FF.....101

Figura 3.5 - Cromatograma após injeção na coluna *Superdex* 75 10/300 GL na etapa de cromatografia de exclusão molecular acoplada ao sistema ÄKTA™102

Figura 3.6 - Análise de proteínas na eletroforese SDS-PAGE em nas alíquotas picos encontrados na cromatografia de exclusão molecular. Coluna *Superdex* 75 10/300 GL.....102

Figura 3.7 – Análise de proteínas por eletroforese SDS-PAGE do extrato purificado de *P. chrysosporium* e do extrato comercial de CBH I de *T. longibrachiatum*, com diferentes cargas de proteína.....103

Figura 3.8 – Cinética de conversão de glucana presente na medula de cana-de-açúcar do híbrido 89 (I), bagaço de cana pré-tratado com 10 % de sulfito e 5 % de NaOH (II), bagaço pré-tratado com ácido diluído (III) e celulose microcristalina (IV) pelos extratos compostos pelas CBHs de *P. chrysosporium* (linhas vermelhas) e *T. longibrachiatum* (linhas pretas).....104

Figura 3.9 – Cinética de conversão de xilana presente na medula de cana-de-açúcar do híbrido 89 (I), bagaço de cana pré-tratado com 10 % de sulfito e 5 % de NaOH (II), bagaço pré-tratado com ácido diluído (III) e celulose microcristalina (IV) pelos extratos compostos pelas CBHs de *P. chrysosporium* (linhas vermelhas) e *T. longibrachiatum* (linhas pretas).....106

(Figuras do Capítulo 4)

Figura 4. 1-. Eletroforese em gel de agarose confirmando a amplificação e mostrando os produtos de PCR das sequências de interesse.....119

Figura 4. 2 – Eletroforese em gel de agarose apresentando os resultados dos PCRs de colônia, para confirmação das cepas bacterianas positivas para a presença dos genes-alvo.....120

Figura 4.3 – Fotografias dos SDS-PAGE apresentando os resultados dos screening de *A. nidulans* contendo as sequências das GH6 (lanes 1-8), GH7-B (lanes 9-16) e GH7C (lanes 17-23).....121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Similaridade (%) entre a sequência gênica codificadora dos domínios catalíticos (branco) e dos módulos de ligação aos carboidratos – CBM (cinza) das celobiohidrolases da família 7 de <i>P. chrysosporium</i> RP-78.....	33
--	----

(Tabelas do capítulo 1)

Tabela 1.1 - Atividade em papel de filtro (FPU) dos extratos de <i>P. chrysosporium</i> puro e com suplementação de β -glicosidase.....	52
Tabela 1.2 - Atividade em papel de filtro (FPU) dos extratos de <i>T. versicolor</i> puro e com suplementação de β -glicosidase.	53

(Tabelas do capítulo 2)

Tabela 2.1 - Teor de proteínas e atividade de celulases e hemicelulases presentes no extrato liofilizado do cultivo de <i>P. chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i> em celulose microcristalina.....	77
Tabela 2.2 - Composição química dos substratos utilizados nos ensaios de hidrólise enzimática.....	78
Tabela 2.3 - Mapeamento das atividades enzimáticas presentes no meio reacional de hidrólise enzimática empregando os extratos enzimáticos de <i>P. chrysosporium</i> e dos extratos comerciais Cellic® CTec2 e Novozyme 188	80
Tabela 2.4 - Mapeamento das atividades enzimáticas presentes no meio reacional de hidrólise enzimática proveniente dos extratos enzimáticos de <i>T. versicolor</i> , comerciais Cellic® ctec2 e Novozyme 188.....	84

(Tabelas do capítulo 4)

Tabela 4.1 - Reações de PCR para amplificação das sequências gênicas de celobiohidrolases.....	114
Tabela 4.2 - Reações de PCR para amplificação das sequências gênicas de celobiohidrolases.....	115
Tabela 4.3 - Iniciadores desenhados para clonagem de celobiohidrolase de <i>P. chrysosporium</i>	118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Composição e recalcitrância dos materiais lignocelulósicos	19
2.2	Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose.....	21
2.3	O papel central das celobiohidrolases na hidrólise de celulose	25
2.4	Fungos degradadores de materiais lignocelulósicos	31
	2.4.1 Celulases produzidas por fungos de degradadores de materiais lignocelulósicos: <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Trametes versicolor</i> como modelo de estudo.....	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivos específicos.....	35
4	ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS	36

CAPÍTULO 1: Obtenção de um extrato enzimático rico em CBH e identificação das proteínas secretadas por <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Trametes versicolor</i> em cultivos induzidos com a presença de celulose microcristalina		37
1.1	INTRODUÇÃO	37
1.2	MATERIAL E MÉTODOS	38
1.2.1	Cultivo de <i>P. chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i> em celulose microcristalina (Avicel) para obtenção de extrato enzimático rico em CBH.....	38
	1.2.1.1 Organismos e preparação de inóculo para os ensaios de produção de CBH.....	38
	1.2.1.2 Ensaios de produção de CBH utilizando Avicel como substrato e obtenção dos extratos enzimáticos.....	39
1.2.2	Análise dos extratos fúngicos através de gel SDS-PAGE	40
1.2.3	Análise da expressão gênica de celobiohidrolases por PCR quantitativo em tempo real (“real-time qPCR”).....	41
	1.2.3.1 Construção dos iniciadores de reação (primers).....	41
	1.2.3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	41
	1.2.3.3 Reação de real-time qPCR para detecção da expressão gênica	42
1.2.4	Atividade em papel de filtro (FPase) dos extratos fúngicos	42
1.2.5	Identificação das proteínas presentes nos extratos de <i>P. chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i> por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC - MS / MS)	43
	1.2.5.1 Preparação e tratamento das amostras para análise de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS/MS)	43
	1.2.5.2 Condições utilizadas nas análises de Nano LC – MS/MS	45
	1.2.5.3 Processamento dos dados brutos gerados pela análise Nano LC – MS/MS	45
	1.2.5.4 Identificação e anotação das proteínas detectadas por LC – MS/MS	46
1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
1.3.1	Avaliação da produção das CBHs nos extratos enzimáticos de <i>P. chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i> através da técnica de SDS-PAGE e quantificação da expressão gênica	47
1.3.2	Avaliação da atividade hidrolítica (FPase) dos extratos enzimáticos de <i>P. chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i>	52
1.3.3	Análise das proteínas secretas por basidiomicetos em celulose microcristalina identificadas por análise de LC MS/MS	54
	1.3.1.1 Análise do secretoma de <i>P. chrysosporium</i> em celulose microcristalina	54
	1.3.1.2 Análise do secretoma de <i>T. versicolor</i> em celulose microcristalina	61
1.4	CONCLUSÃO	66
1.5	REFERÊNCIAS.....	67

CAPÍTULO 2: Avaliação do potencial de extratos enzimáticos de basidiomicetos ricos em celobiohidrolases na sacarificação de materiais lignocelulósicos.....	70
2.1 INTRODUÇÃO.....	70
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.2.1 Cultivo de <i>P. chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i> em celulose microcristalina (Avicel) para obtenção de extrato enzimático rico em CBH	71
2.2.2 Determinação das atividades enzimáticas nos extratos fúngicos e em misturas comerciais.....	72
2.2.2.1 Atividade de celulasas totais (FPase)	72
2.2.2.2 Atividade de Celobiohidrolases (Avicelase)	73
2.2.2.3 Atividade de Endoglucanases (CMCase).....	73
2.2.2.4 Atividade de β -glicosidase	74
2.2.2.5 Atividade de Xilanase.....	75
2.2.2.6 Atividade de β – xilosidase	75
2.2.3 Quantificação de proteínas totais	75
2.2.4 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos empregando os extratos fúngicos.....	76
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
2.3.1 Caracterização das atividades de enzimas hidrolíticas presentes nos extratos enzimáticos de <i>P. chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i>.....	77
2.3.2 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos empregando os extratos de <i>P. chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i>.....	78
2.3.2.1 Digestibilidade dos substratos quando utilizado extrato enzimático de <i>P. chrysosporium</i>	79
2.3.2.2 Digestibilidade dos substratos quando utilizado extrato enzimático de <i>T. versicolor</i>	83
2.4 CONCLUSÕES.....	87
2.5 REFERÊNCIAS	88

CAPÍTULO 3: <u>Produção e purificação de uma celobiohidrolase I (GH7) de <i>P. chrysosporium</i> e avaliação do seu potencial na sacarificação da biomassa vegetal</u>	91
3.1 INTRODUÇÃO.....	91
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	92
3.2.1 Produção, concentração e liofilização dos extratos de <i>P. chrysosporium</i> rico em CBH	92
3.2.2 Purificação de celobiohidrolase do extrato liofilizado de <i>P. chrysosporium</i>	93
3.2.2.1 Precipitação com sulfato de amônio e ultrafiltração para remoção de sais ..	93
3.2.2.2 Clean-up da amostra por cromatografia de troca iônica em bancada.....	94
3.2.2.3 Purificação da proteína por cromatografia de troca iônica e gel filtração em sistema HPLC.....	94
3.2.2.4 Análise de perfil proteico das frações por eletroforese SDS-PAGE, dosagem da concentração de proteína e atividade de celobiohidrolase	95
3.2.3 Ensaio de hidrólise enzimática de substratos à base de biomassa de cana de açúcar	96
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.3.1 Produção e purificação de celobiohidrolase de <i>P. chrysosporium</i>.....	97
3.4 CONCLUSÕES.....	107
3.5 REFERÊNCIAS	108

CAPÍTULO 4: Clonagem e expressão heteróloga de celobiohidrolases de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	110
4.1 INTRODUÇÃO	110
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	111
4.2.1 Microrganismos e meios de cultura de manutenção das cepas	111
4.2.2 Seleção de genes codificantes de celobiohidrolases, identificação e análise de bioinformática das sequências obtidas	112
4.2.3 Clonagem dos genes de celobiohidrolases	112
4.2.3.1 Extração de DNA genômico	112
4.2.3.2 Vetor de clonagem e construção dos iniciadores de reação (primers)	113
4.2.3.3 Amplificação das sequências gênicas e reação de ligação dos fragmentos gênicos ao vetor de clonagem	113
4.2.3.4 Inserção dos vetores em células competentes de <i>E. coli</i> , identificação das colônias positivas e extração de DNA plasmidial	114
4.2.4 Expressão heteróloga das celobiohidrolases em <i>A. nidulans</i> A773	116
4.2.4.1 Obtenção dos protoplastos	116
4.2.4.2 Transformação e confirmação dos clones transformantes	117
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
4.3.1 Clonagem de genes de celobiohidrolase de <i>P. chrysosporium</i> em <i>E. coli</i>	118
4.3.1.2 Amplificação das sequências gênicas	118
4.3.1.2 Clonagem das sequências gênicas de celobiohidrolases de <i>P. chrysosporium</i> em <i>E. coli</i> TOP10®	119
4.3.2 Expressão heteróloga de celobiohidrolases de <i>P. chrysosporium</i> em <i>A. nidulans</i>	121
4.4 CONCLUSÕES	122
 5 CONCLUSÕES GERAIS	 125
 REFERÊNCIAS	 127
 APÊNDICE A	 136
APÊNDICE B	137
APÊNDICE C	138

1 INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos, compostos de celulose, hemicelulose e lignina, apresentam grande potencial para aplicações biotecnológicas. Com a crescente demanda por fontes renováveis de energia, o bagaço de cana se destaca como uma biomassa vegetal abundante no Brasil, uma vez que é gerado como subproduto da produção de etanol e açúcar. Este material lignocelulósico pode ser diretamente queimado para gerar energia térmica ou processado para produzir biocombustíveis líquidos e/ou outros insumos químicos. Para realizar a conversão do bagaço de cana em insumos químicos ou biocombustíveis é necessário desenvolver uma série de tecnologias que incluem a conversão dos polissacarídeos a monossacarídeos por via enzimática.

Dentre os polissacarídeos da biomassa vegetal, a conversão de celulose em glicose tem sido o objetivo de um segmento industrial emergente que visa converter materiais lignocelulósicos em combustíveis e insumos químicos (BENTIL et al., 2018; CUNHA et al., 2017). A conversão enzimática da celulose tem sido considerada uma estratégia atraente devido à possibilidade de se alcançar rendimentos de sacarificação próximos aos teóricos. A conversão enzimática de celulose em glicose requer a ação sinérgica de um grupo de enzimas que são classificadas no banco de dados CAZy ("enzimas ativas sobre carboidratos") como glicosil hidrolases (GHs) e como enzimas auxiliares (AAs) (HENRISSAT et al., 1991; PAYNE et al., 2015)

A desconstrução da celulose a glicose é um processo complexo e envolve a ação de diversas enzimas. No grupo das GHs, as enzimas envolvidas são as endoglucanases (EG), as celobiohidrolases (CBH) e as β -glicosidades (BGL). As EGs hidrolisam, de forma randômica, ligações glicosídicas no interior da cadeia. As CBHs hidrolisam ligações glicosídicas nas extremidades das cadeias de celulose formando, principalmente, moléculas de celobiose. Durante sua atuação, as CBHs possuem maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina. As BGLs atuam clivando a celobiose em duas moléculas de glicose (PAYNE et al., 2015). Além das GHs, esse processo de quebra da celulose, envolve também enzimas oxidativas. As LPMOs (enzimas auxiliares – AAs) são responsáveis por clivar ligações glicosídicas por via oxidativa na superfície da celulose cristalina originando novos pontos de acesso para as CBH. As CBHs, em particular, são consideradas

enzimas-chaves no processo de hidrólise, pois são as únicas capazes de hidrolisar celulose cristalina extensivamente. Estão classificadas nas famílias das glicosil hidrolases 6 e 7, de acordo com a extremidade da cadeia de celulose que hidrolisam: redutora (GH7) e não redutora (GH6). Além disso, CBHs são as proteínas predominantemente secretadas pela maioria dos microrganismos produtores de celulases, atingindo até 80% do total de proteínas secretadas por *T. reesei* (PAYNE et al., 2015). No entanto, para que haja ação eficaz dessas hidrolases sobre a celulose de biomassas lignocelulósicas, as enzimas precisam ter acesso direto ao substrato, que, além de insolúvel, está contido na parede celular secundária e envolto por hemicelulose e lignina.

Para superar a dificuldade de acesso das enzimas ao substrato, procedimentos de pré-tratamento são aplicados para desconstruir parcialmente a parede celular dos lignocelulósicos. Estes pré-tratamentos induzem modificações físicas e químicas na matriz lignocelulósica, proporcionando um aumento do acesso físico de enzimas ao substrato polissacarídico, possibilitando assim, a obtenção de maiores rendimentos de hidrólise (MENON; RAO 2012; WYMAN et al., 2005; ZHANG et al., 2013). Embora o material lignocelulósico passe por essa etapa de pré-tratamento, a etapa de hidrólise enzimática ainda necessita superar a recalcitrância residual do material. Por isso, o estudo de microrganismos capazes de realizar a degradação da biomassa e das enzimas envolvidas nesse processo apresentam papel chave no desenvolvimento continuado das tecnologias de conversão de biomassa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição e recalcitrância dos materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são uma fonte de carboidratos abundantes e renováveis. Diferentes características do material lignocelulósico podem afetar ou estar relacionadas à recalcitrância a ação enzimática. A organização e interação entre os componentes da parede celular são fatores que conferem a esses materiais uma alta recalcitrância (FERRAZ et al., 2014). Para a utilização dos materiais lignocelulósicos em processos biotecnológicos é crucial o entendimento da constituição da parede celular lignificada. A lignocelulose representa mais de 90% do peso seco de uma célula vegetal, sendo composta por celulose, hemicelulose e lignina, unidos fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes conferindo a parede celular uma ultraestrutura complexa, densa e pouco porosa (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é o principal e mais abundante componente da parede celular (cerca de 40%). É descrita como um homopolímero formado por longas cadeias lineares de unidades de anidroglicopiranoses (D-glicose) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) (FENGEL; WEGENER, 1989; HORN et al., 2012). Cada molécula de D-glicose apresenta orientação de 180° em relação a outra molécula. Essa configuração confere a cadeia de celulose duas extremidades com características distintas. A extremidade da cadeia de celulose onde se encontra o carbono anomérico livre é chamada de extremidade redutora, ao passo que a extremidade onde o carbono anomérico não está disponível é chamada de extremidade não redutora (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática de uma porção da cadeia de celulose.

Fonte: Adaptado de Zhang; Lynd (2004)

A celulose possui uma média de 10.000 unidades glicosídicas dispostas linearmente. Essa configuração linear da cadeia de celulose permite a formação de ligações de hidrogênio intramolecular gerando assim uma cadeia rígida que se agrega a outras cadeias através de ligações de hidrogênio intermoleculares. As cadeias de celuloses agregadas contêm regiões mais ordenadas dando origem a estruturas cristalinas que ao se reunirem formam as fibrilas elementares (FENGEL; WEGENER, 1989).

As ligações de hidrogênio intra e intermoleculares entre as cadeias e a completa ausência de água na estrutura das fibrilas, fazem com que a celulose se torne uma estrutura rígida e insolúvel, garantindo proteção osmótica e resistência mecânica, dificultando à reação com reagentes químicos ou enzimas e a sua conversão em monômeros fermentescíveis (LYND et al., 2002; FENGEL; WEGENER, 1989). Além da porção cristalina, em alguns pontos das fibrilas elementares as moléculas de celulose estão dispostas de maneira menos ordenada (porção amorfa) e a quantidade relativa de cada porção pode ser estimada em termos do índice de cristalinidade (ZHANG; LYND, 2004).

A parede celular contém ainda cerca de 20-30% de hemicelulose ou polioses, que corresponde a polímeros diversos, de cadeias mais curtas que a celulose (entre 100 e 200 glicosídeos). A existência de grupos pendentes na cadeia polissacarídica principal faz com que a hemicelulose não apresente regiões cristalinas. As hemiceluloses contêm diferentes carboidratos tais como xilose, arabinose, manose, galactose, glicose e ácidos urônicos (STAMBUK et al., 2008). Em gramíneas, como a cana-de-açúcar, a principal hemicelulose é a 4-O-metilglucurono-arabinoxilana (MASARIN et al., 2011; PANDEY et al., 2000). Essa hemicelulose é formada por uma cadeia principal de xilana (polímero de D-xilopiranosil com ligações β -(1,4)) e apresenta como grupos pendentes α -arabinofuranosil, ácidos metil-glucurônicos, acetilas e ácido ferúlico (WENDE; FRY, 1997). O ácido ferúlico pode envolver a associação da xilana com a lignina ou mesmo interligar duas cadeias de xilana no caso de uma ligação envolvendo um diferulato (RENNIE; SCHELLER, 2014, HORN et al., 2012).

A lignina é o terceiro componente da parede celular (20 e 30%) e representa a principal porção não polissacarídica. A lignina possui uma estrutura aromática disposta em uma rede macromolecular. Trata-se de uma macromolécula composta basicamente por unidades de fenilpropano associadas por ligações estáveis do tipo

C–C, aril-éter e diarílicas, sendo as mais abundantes β -O-4 e α -O-4 (40–60 %) (ADLER, 1977; HON; SHIRAISHI, 2001; HENRIKSSON, 2009). É o mais abundante composto aromático na natureza e serve como um ligante entre as fibras da madeira dando rigidez e força à estrutura. A lignina contida nas paredes celulares confere rigidez a parede celular e evita que elementos condutores de água colapsem (RAMOS, 2003). O efeito protetor conferido pela lignina à parede celular está baseado na sua distribuição topoquímica no interior da parede. A baixa polaridade relativa das unidades fenil-propano torna a lignina hidrofóbica o que confere maior resistência à parede celular vegetal no que diz respeito à absorção de água e a consequente possibilidade de degradação microbiana e enzimática, através da impregnação dos polissacarídeos e minimizando assim a porosidade do material, impedindo a infiltração eficiente das enzimas (HAMMEL; CULLEN, 2008, LEE; MOON, 2003, ÖNNERUD et al., 2002). Em gramíneas, a lignina pode ainda formar ligações covalentes com a hemicelulose através de um éster dos grupos arabinosil com ácido ferúlico que se liga então à lignina através do oxigênio da posição 4 na forma de um éter (MASARIN et al., 2011). Essas interações que protegem a planta contra o ataque de microrganismos conferem uma coesão à estrutura interna, além de auxiliar na resistência ao esforço mecânico (FENGEL; WEGENER, 1989; HOFRICHTER, 2002).

2.2 Enzimas envolvidas na hidrólise da celulose

A biodegradação de materiais lignocelulósicos na natureza ocorre majoritariamente pela ação de fungos e constitui um importante processo de reciclagem da matéria orgânica. O processo é extracelular, pois, somente compostos solúveis e susceptíveis ao metabolismo intracelular penetram a membrana celular dos fungos. Com isso, as hifas fúngicas penetram pelo lúmen das células vegetais e liberam enzimas hidrolíticas e oxidativas que degradam os tecidos vegetais em moléculas menores (FENGEL; WEGENER, 1989; LEVY, 1987).

As enzimas responsáveis pela desconstrução da parede celular estão classificadas em uma base de dados denominada CAZy (*Carbohydrate-Active enzymes*), correspondendo, portanto, a “enzimas ativas em carboidratos”. A classificação desse grupo de enzimas no CAZy se baseia nas semelhanças de

sequências de aminoácidos e estruturas proteicas (HENRISSAT et al., 1991). Essas enzimas estão distribuídas em classes como glicosil hidrolases (GH, *glucosyl hidrolases*), carboidrato esterases (CE, *carbohydrate esterases*), polissacarídeo liases (PLs) e enzimas auxiliares (AA, *auxiliary activities*).

A quebra completa da celulose requer um conjunto amplo de enzimas (Figura 2). Os três principais grupos de enzimas hidrolíticas que fazem parte do complexo celulolítico são (LADISCH et al., 1983; LYND et al., 2002; WRIGHT et al., 1988):

I. Endoglucanases: as endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4) atuam nas regiões amorfas da celulose, hidrolisando ligações glicosídicas randomicamente ao longo da cadeia. Essas quebras geram frações de celulose com menor grau de polimerização criando assim terminais livres na cadeia. As endoglucanases podem ser encontradas em diversas famílias no CAZy: GHs 5, 6, 7, 8, 9, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 74 e 124.

II. Celobiohidrolases: as exo-1,4- β -glucanases ou celobiohidrolases (CBH) degradam a molécula a partir das extremidades, removendo unidades de celobiose. As CBHs podem ainda ser divididas em dois tipos: CBH I (EC 3.2.1.91) que atuam sobre terminais redutores e está presente na família 7 das GHs e CBH II (EC 3.2.1.176) que hidrolisam terminais não redutores da celulose e são da família 6 das GHs. As celobiohidrolases são inibidas pelo seu produto, a celobiose. (CASTRO e PEREIRA Jr, 2009)

III. β -glicosidases: as 1,4- β -glicosidases (EC 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose à glicose (WRIGHT et al., 1998). São encontradas nas famílias 1, 2, 3, 5, 9, 16, 30, 39 e 116 das GHs no CAZy. A β -glicosidase não é considerada uma celulase específica, pois não atua diretamente na cadeia de celulose. As β -glicosidase são enzimas acessórias a ação das celobiohidrolases já que são inibidas por elevadas quantidades de resíduos de celobiose (WOOD et al. 1994).

A ação das celulases sobre a celulose é um processo de catálise heterogênea. Desta forma, a ação da enzima requer uma etapa prévia de adsorção ao substrato. EGs e CBHs podem executar a adsorção pela presença de um domínio não catalítico, denominado módulo de ligação ao carboidrato - CBM (*Carbohydrate-Binding Modules*). Embora os domínios de ligação a celulose não sejam essenciais para a atividade catalítica, eles modulam a ligação específica das enzimas em substratos celulósicos solúveis e insolúveis. A presença dos CBMs é particularmente importante para o início da reação e a processividade das CBHs e

de algumas EGs (SEGATO et al., 2014). O CBM se liga na celulose cristalina enfraquecendo as ligações de hidrogênio entre as microfibrilas, ajudando na separação das mesmas e na progressão da enzima (ARANTES, SADDLER, 2010). Além disso, ao promover a ligação da enzima ao substrato faz com a concentração pontual de enzima na superfície da celulose seja elevada. Foi observado que a remoção do CBM não afeta a eficiência de hidrólise de substratos solúveis, mas a hidrólise de celulose pura é reduzida consideravelmente na ausência da estrutura (ZHANG; LYND, 2004; CHUNDWAT et al., 2011). Contudo, a presença de CBM na hidrólise de materiais lignificados pode reduzir a hidrólise da celulose devido ao fenômeno de adsorção improdutiva das enzimas à lignina que também se dá pela ação dos CBMs (YANG et al., 2011). Ao aderirem a outros componentes, como a lignina ou hemicelulose, que não seja seu substrato, as enzimas participam de uma adsorção improdutiva, diminuindo assim a eficiência da hidrólise enzimática. Como observado por Rahikainen et al., (2011) e Várnai et al., (2010), a lignina impede a hidrólise da lignocelulose por adsorção não produtiva das enzimas via CBMs.

O sistema degradativo da celulose também conta com a participação de enzimas oxidativas. Estas enzimas podem agir sobre as cadeias de celulose rompendo a ligação glicosídica presente no polímero, auxiliando assim a atividade das celulasas previamente descritas. Um grupo de enzimas oxidativas que auxilia na quebra da celulose contém as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos LPMOs (do inglês: *lytic polysaccharide monooxygenases*). São metaloproteínas capazes de clivar ligações glicosídicas por via oxidativa na superfície da celulose cristalina e inicialmente formaram a família 9 das AAs (LEVASSEUR et al., 2013). Ao longo de mais estudos, mais proteínas com atividade sobre a celulose foram adicionadas as famílias AA10, AA15 e AA16 (FILIATRAULT-CHASTEL et al., 2019; SABBADIN et al., 2018; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010). Foram descritas também diversas LPMOs com atividade sobre outros substratos polissacarídicos, como quitina (AA10, AA11 e AA15), xilana (AA14) e amido (AA13), expandindo o conhecimento sobre a diversidade de ação dessas enzimas auxiliares (COUTURIER et al., 2018; HEMSWORTH et al., 2014; VU et al., 2014).

Outro grupo de enzimas que podem atuar na celulose inclui as celobiose desidrogenases (CDH- EC 1.1.99.18). Essas enzimas estão classificadas dentro das famílias AA3 e AA8 no CAZy. Embora a função fisiológica da CDH na degradação da celulose não tenha sido elucidada ainda (WANG; LU, 2016) algumas

observações experimentais relatadas a essa função foram feitas: As CDHs atuam sobre a celobiose, celooligossacarídeos e, inclusive, a celulose, oxidando o terminal redutor; a ação oxidativa da CDH acarreta uma redução na inibição das CBHs já que essas sofrem inibição pelo produto, como anteriormente mencionado, levando a uma maior atividade observada na atividade das CBHs. Essa interação entre a atividade da CDH e o aumento da atividade de CBH foi observado em *Phanerochaete chrysosporium* por Igarashi, Samejima e Eriksson (1998). Outra evidência dessa interação foi observada entre CDHs de *P. chrysosporium*, expressas heterologamente em *Pichia pastoris*, auxiliando na atividade da CBH nativa de *Trichoderma reesei* (WANG; LU, 2016). Além disso, há evidências de que a celobiose desidrogenase tenha como papel a geração de elétrons necessários às LPMOs no sistema de degradação da celulose, mas também possa participar no processo de degradação da lignina por fungos (RYTIOJA et al., 2014). Esta enzima também pode reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} que, na presença de peróxido de hidrogênio, proporciona a reação de Fenton, gerando radicais hidroxilas, que podem atuar na despolimerização dos polissacarídeos e modificar a estrutura da lignina (AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Além das enzimas oxidativas descritas anteriormente, proteínas sem atividade catalítica têm sido reportadas como capazes de atuar sobre celulose. As expansinas e as swoleninas, por exemplo, podem atuar alterando a estrutura da celulose cristalina, o que favorece a sua sacarificação. Tem sido sugerido que a ação dessas proteínas é de afrouxar ou perturbar o empacotamento da cadeia de celulose. A atividade de desestruturação destas proteínas pode auxiliar sinergicamente as celulasas no sentido de aumentar a acessibilidade das CBHs às cadeias de celulose (ARANTES; SADDLER, 2010). A figura 2 esquematiza a ação das enzimas anteriormente descritas na degradação da celulose.

Figura 2 - Esquema de degradação da celulose a partir da ação das enzimas endo-1,4-β-D-glucanase (EG), celobiohidrolases (CBHI e CBHII), 1,4-β-Dglucosidase (BGL), celobiose desidrogenase (CDH) e monooxigenases líticas depolissacarídeos (LPMO1, 2 e 3).

Fonte: Rytioja et al., 2014.

2.3 O papel central das celobiohidrolases na hidrólise de celulose

Coquetéis enzimáticos comerciais apresentam uma mistura complexa de enzimas essenciais à degradação da celulose e hemicelulose, cujas atividades estão atualmente bem descritas na literatura (GUSAKOV, 2011; PAYNE ET AL., 2015). As celobiohidrolases (CBHs) representam o principal componente dos coquetéis enzimáticos comerciais, comumente empregados nos processos de hidrólise enzimática. Sabe-se que o extrato mais utilizado nas preparações comerciais é produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* (sinonímia *Hypocrea jecorina*), o qual apresenta uma alta concentração de CBHs.

A hidrólise da ligação glicosídica catalisada pelas celobiohidrolases pode ser explicada por dois mecanismos distintos (MCCARTER; STEPHEN WITHERS, 1994). O mecanismo de ação catalítica da CBHI é caracterizado pela retenção na configuração do carbono anomérico da glicose. Esta ação pode ser explicada por um mecanismo de hidrólise que consiste em dois passos de deslocamento individual de elétrons entre os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico e a celulose, incluindo a formação de um intermediário que é formado pela enzima covalentemente glicosilada (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismo de retenção na ação catalítica das celobiohidrolases I. O mecanismo de retenção emprega um mecanismo catalítico de duas etapas e deslocamento duplo. Na primeira etapa, o resíduo nucleofílico ataca o carbono anomérico simultaneamente com a transferência de prótons do resíduo ácido para o oxigênio glicosídico, resultando na formação do intermediário glicosil-enzima e na clivagem da ligação glicosídica. Na segunda etapa, uma molécula de água entra no local ativo e ataca o carbono anomérico, transferindo simultaneamente um próton para a base catalítica, restaurando assim o local ativo da enzima para posterior catálise.

Fonte: Payne et al. (2015).

O sítio ativo da CBHI consiste em três resíduos de aminoácidos carboxílicos (glutamato (Glu) e aspartato (Asp)) que são essenciais tanto na catálise como na discriminação quiral durante a hidrólise da ligação glicosídica (DIVNE et al., 1994). Nas CBHI os resíduos catalíticos estão posicionados pertos um do outro numa sequência consenso Glu-X-Asp-X-X-Glu, onde o primeiro glutamato age como um nucleófilo e o outro, na forma de ácido glutâmico, atua como um ácido. O resíduo de aspartato auxilia na estabilização do substrato no sítio catalítico por meio de ligações de hidrogênio. Ao se formar a estrutura glicosilada da enzima, ocorre a adição de água ao carbono anomérico auxiliada pela ação do segundo glutamato, atuando agora como base (Figura 3). O mecanismo de retenção quiral descrito para a CBH I foi inicialmente proposto a partir da descrição da estrutura 3D da enzima purificada de *Hypocrea jecorina* (HjeCel7A) (DIVNE et al., 1994). A proposta foi decorrente da identificação da posição dos resíduos dos aminoácidos anteriormente citados quando a proteína foi cristalizada com a presença da molécula de o-iodo-benzol-celobiosídeo ligado ao sítio ativo. O trabalho de Ståhlberg et al. (1996) também sustentou esse mecanismo através de estudos mutacionais com a mesma enzima (Cel7A), além de demonstrar que o resíduo de aspartato no sítio ativo é importante na catálise por auxiliar no posicionamento de um dos Glu ou no seu estado de protonação.

No caso da ação das CBHII, o mecanismo que explica a inversão na configuração da glicose inclui uma etapa única de reação onde a água age como

nucleófilo, atacando diretamente o carbono anomérico da glicose (Figura 4) (MCCARTER; STEPHEN WITHERS, 1994; MUÑOZ et al., 2001). O sítio ativo da CBHII consiste em dois resíduos do aminoácido carboxílicos (ambos sendo aspartatos (Asp)), funcionando como um par ácido/base.

Figura 4 - Mecanismo de inversão na ação catalítica das celobiohidrolases II. O mecanismo de inversão emprega um mecanismo catalítico de deslocamento único, em que uma molécula de água realiza ataque nucleofílico no carbono anomérico, uma base catalítica abstrai um próton da molécula de água atacante e um ácido catalítico transfere um próton para o oxigênio glicosídico para clivar a ligação glicosídica, resultando em uma inversão da estereoquímica no carbono anomérico.

Fonte: Payne et al. (2015).

Do ponto de vista estrutural, frequentemente as celobiohidrolases são descritas como proteínas bimodulares, com um módulo de ligação ao carboidrato (CBM) conectado a um domínio catalítico (CD) por um *linker* peptídico (BECKHAM et al., 2010). As CBHs de diferentes organismos apresentam elevada identidade nas sequências de aminoácidos que compõem o domínio catalítico (>50%), sendo que os dobramentos e o sítio ativo são altamente conservados. Estruturas tridimensionais do domínio catalítico de CBHI e CBHII foram originalmente determinadas para enzimas produzidas pelo ascomiceto *T. reesei*. Estes estudos demonstraram que ambas CBHs possuem uma região com uma cavidade em forma de canal com diversas dobras flexíveis (loops) que resultam em uma estrutura em forma de túnel, onde estão localizados os sítios ativos (Figura 5) (DIVNE et al., 1994, DIVNE et al., 1998; SEGATO et al., 2012, TEERI et al., 1999).

Figura 5 - Representação do domínio catalítico em forma de túnel de uma celobiohidrolase II de *T. reesei*. Em laranja, os resíduos catalíticos.

Fonte: Davies; Henrissat (1995).

No caso da estrutura tridimensional das CBHs I, o domínio catalítico foi elucidado primeiramente para a celobiohidrolase de *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) por Divne et al. (1994). Posteriormente, CBHs I de diferentes fungos como *P. chrysosporium*, *Talaromyces emersonii*, *Heterobasidion irregulare* tiveram suas estruturas descritas e foi possível verificar que existe alta similaridade na estrutura deste domínio (GRASSICK et al., 2004, MOMENI et al., 2013, MUÑOZ et al., 2001).

A estrutura do domínio catalítico da CBH I (Figura 6) consiste de duas folhas beta (folhas β) antiparalelas, dispostas frente a frente formando uma estrutura do tipo β -sanduíche, quatro α -hélices e longas alças conectando as fitas β (DIVNE et al., 1994, GRASSICK et al., 2004, MUÑOZ et al., 2001). As duas folhas β formam uma superfície côncava e outra convexa, que contêm sete e oito fitas β antiparalelas, respectivamente. As alças que conectam as fitas β formam um túnel de aproximadamente 50 Å, que representa o sítio ativo onde o substrato é acomodado (DIVNE et al., 1998). Esse longo túnel conta com a presença de 9 *subsites* de ligação à celulose (DIVNE et al., 1998). Esses *subsites* foram numerados de -7 a +2 no sentido do terminal não redutor para o terminal redutor na cadeia de celulose, com o sítio catalítico localizado entre os *subsites* -1 e +1.

Figura 6.- Representação esquemática do domínio catalítico da CBHI de *T. reesei* com um celooligômero ligado aos *subsites* -7 a +2. Observa-se os elementos estruturais secundários como folhas- β (azul), α -hélices (vermelhas) e regiões de *loop* (amarelo) O celooligômero é mostrado em rosa. A ilustração foi criada com MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

Fonte: DIVNE et al. (1998).

A estrutura do domínio catalítico das CBHs I apresenta diferenças quando comparada a do domínio das celobiohidrolases II já determinadas (DIVNE et al., 1994). A estrutura do domínio catalítico da CBHII de *T. reesei* consiste em um domínio único, em que sete fitas β estão arranjadas em estrutura de barril e as seis primeiras fitas são conectadas por α -hélices, sendo que a conexão entre a sexta e a sétima fita é irregular. A estrutura de barril e as alças formam um túnel fechado de aproximadamente 20 Å, duas vezes mais curto que o túnel da CBH I (VARROT et al., 2003).

A principal característica das celobiohidrolases é a sua ação processiva em cadeias individuais de celulose pela repetida liberação de celobiose. Essas enzimas apresentam seu mecanismo catalítico dentro de um túnel fechado mantendo presa uma única cadeia de celulose destacada da superfície cristalina (Figura 7). A atividade catalítica se repete processivamente ao longo da cadeia de celulose destacada, impedindo assim que a cadeia de celulose se junte ao meio cristalino novamente (HORN et al., 2012; VARROT et al., 2003). O modo de ação das celobiohidrolases sobre a celulose está ilustrado na figura 7.

Figura 7 - Complexo catalítico ativo de *T. reesei* CBHI (GH7) sobre a celulose. A enzima destaca uma das cadeias de celulose (verde) da superfície do polímero fazendo com que a cadeia se posicione no sítio catalítico da enzima que está dentro do túnel, quebrando assim a cadeia de celulose em moléculas de celobiose.

Fonte: TAYLOR et al. (2012).

Apesar de altamente conservadas no que diz respeito às sequências de aminoácidos e estrutura terciária, há variações estruturais entre as celobiohidrolases de diferentes organismos. A variação entre as CBHs pode estar relacionada primariamente com alteração na sequência de aminoácidos, bem como no comprimento dos loops que constroem o túnel de ligação ao substrato. A partir de simulações de dinâmica molecular foi proposto que o comportamento dinâmico das regiões de loops difere significativamente entre celobiohidrolases de diferentes fungos, o que provavelmente pode ser relacionado com diferenças na processividade da enzima, endo-iniciação (ligação do domínio catalítico a cadeia de celulose) e na susceptibilidade à inibição por produto (MOMENI et al., 2013).

Exemplos de variações estruturais entre celobiohidrolases podem ser observados no trabalho de von Ossowski et al. (2003) que demonstram que a estrutura da CBH I de *H. jecorina* (*HjeCel7A*) exibe um túnel mais fechado quando comparado com o de CBH I de *P. chrysosporium* (*PchCel7D*). Esta última enzima possui um túnel mais aberto devido a diversas deleções de aminoácidos e a redução no tamanho das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos na ponta do túnel. Como resultado destas alterações, foi demonstrado que *PchCel7D* demonstra uma menor inibição por celobiose e maior velocidade de degradação de celulose microcristalina (MOMENI et al., 2013).

2.4 Fungos degradadores de materiais lignocelulósicos

Os organismos mais eficientes na biodegradação de materiais lignocelulósicos são os fungos, os quais tem extrema importância no ciclo do carbono na natureza, devido a sua capacidade de degradar fontes complexas de carbono mostrando importante papel no processo de reciclagem da biomassa vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989; LEVY, 1987). Os fungos degradadores de matérias lignocelulósicos (também conhecidos como degradadores de madeira) constituem um grupo não taxonômico (engloba fungos basidiomicetos e alguns ascomicetos) caracterizados pela capacidade em degradar materiais lignocelulósicos de maneira eficiente e pela síntese de enzimas hidrolíticas e oxidativas que atuam sobre substratos ricos em celulose, hemicelulose e lignina (FERRAZ, 2010). Entre as inúmeras espécies de fungos, destaca-se o filo Basidiomycota, que engloba cerca de 30.000 espécies, correspondendo a 37% do número descrito dos fungos verdadeiros (KIRK et al., 2008).

São classificados de acordo com os padrões de degradação que apresentam, levando-se em conta a característica macroscópica da degradação: fungos de degradação parda ou branca (FERRAZ, 2010). Os fungos causadores de decomposição parda degradam principalmente os polissacarídeos (celulose e hemicelulose) presentes no material, enquanto a lignina é modificada estruturalmente através de reações de desmetilação ou hidroxilação (KIRK, 1983). Por degradarem principalmente os polissacarídeos, geram um resíduo enriquecido em lignina, logo, a madeira degradada por esses fungos tem um aspecto amarronzado e de aparência frágil (BLANCHETTE, 1991).

Os fungos causadores de podridão branca são os mais eficientes degradadores de lignina, podendo degradá-la seletivamente ou simultaneamente aos polissacarídeos. A forma de degradação mais típica envolve a remoção simultânea dos três principais componentes dos materiais lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) e a menos frequente envolve a remoção seletiva da lignina e hemicelulose, mantendo a celulose praticamente intacta. A remoção da lignina faz com que os materiais decompostos por esses fungos adquiram uma cor esbranquiçada e sejam facilmente rompidos no sentido da fibra (FERRAZ, 2010). Esse grupo de fungos produz todas as enzimas extracelulares necessárias para a hidrólise completa da celulose, com variação no nível de cada atividade enzimática.

2.4.1 Celulases produzidas por fungos de degradadores de materiais lignocelulósicos: *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* como modelo de estudo.

A busca por enzimas com melhor eficiência para a hidrólise enzimática da biomassa aponta como ótimas candidatas as enzimas secretadas por fungos degradadores de materiais lignocelulósicos. Fungos de decomposição branca são os mais eficientes degradadores da biomassa vegetal lignificada, o que permite supor que tais organismos apresentem complexos celulolíticos mais adaptados à degradação de materiais lignocelulósicos de elevada recalcitrância. Esses fungos têm o arsenal mais extenso de “enzimas ativas em carboidratos” putativas entre os basidiomicetos, permitindo que eles colonizem uma ampla variedade de plantas lignificadas. (FLOUDAS et al., 2012). Nos últimos anos tem aumentado o número de estudos que sequenciam e anotam o genoma dos fungos degradadores de madeiras (CASADO-LÓPEZ et al., 2019; GASKELL et al., 2017; MÄKELÄ et al., 2018; OHM et al., 2014). Os genes codificadores das enzimas das famílias 6 e 7 das GHs, que incluem majoritariamente CBHs, apresentam de 1 a 7 cópias do gene em todos os genomas sequenciados de fungos de decomposição branca (RYTIOJA et al., 2014). Dentre as diversas espécies de fungos de degradação branca descritas na literatura, *P. chrysosporium* e *T. versicolor* foram escolhidos para ser utilizados no desenvolvimento do presente projeto, pois são degradadores eficientes de biomassa lignificada e contam com o genoma sequenciado e anotado disponível na literatura (FLOUDAS et al., 2012, MARTINEZ et al., 2004; OHM et al., 2014).

Entre os fungos de degradação branca, a espécie *P. chrysosporium* é a mais amplamente caracterizada, sendo o primeiro basidiomiceto de decomposição da madeira a ter o genoma sequenciado. Esse fungo foi extensivamente estudado, pois emprega várias enzimas no processo de biodegradação de lignocelulósicos. A diversidade de trabalhos envolve a ação do fungo como pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (BAK et al., 2009, KELLER et al., 2003, SAWADA et al., 1995), o estudo e a produção de enzimas que agem na deslignificação da biomassa, além de trabalhos e revisões sobre o tema (CULLEN; KERSTEN, 1996, CULLEN, 1997, HIGUCHI, 1990). Contudo, a produção de enzimas hidrolíticas para uso em processos de biorrefino de biomassa a partir de *P. chrysosporium* foi

explorada por um número reduzido de trabalhos até a presente data (SARATALE et al., 2014, THOMAS et al., 2013).

Sabe-se que as celulases de *P. chrysosporium* possuem transcrição diferenciada, dependendo do substrato e do estágio de degradação. *P. chrysosporium* secreta CBHI, CBHII, EGs e BGLs quando crescido sobre celulose microcristalina (Avicel) (WYMELENBERG et al., 2006). A celobiohidrolase 58 (*PchCel* 7D) foi descrita como a celulase mais secretada pelo fungo *P. chrysosporium*, constituindo aproximadamente 10 % do total de proteínas produzidas extracelularmente em cultivos sobre a celulose durante a fermentação submersa (MUÑOZ et al., 2001). Do ponto de vista genômico, foi observado que *P. chrysosporium* possui uma proteína da família GH6 (*Cel6A*) e pelo menos seis celobiohidrolases da família 7 (*Cel7A* a *Cel7F/G*) (MARTINEZ et al., 2004). As *Cel7* estão localizadas em sete loci diferentes e incluem uma duplicação da mesma sequência (*Cel7F* e *Cel7G*) (WYMELENBERG et al., 2006). Além disso, o genoma de *P. chrysosporium* abriga informação genética para codificar 356 CAZymes, sendo destas, 177 codificantes de GHs (RILEY et al., 2014).

P. chrysosporium pode ser considerado um organismo modelo dentro do filo Basidiomycota uma vez que há vasta literatura sobre suas enzimas oxidativas (CULLEN, 1997, KERSTEN; CULLEN, 2007, RODRÍGUEZ-COUTO et al., 2003) e hidrolíticas, com destaque para o grupo das celulases (IGARASHI et al. 2008). Com as informações disponíveis é possível obter uma relação entre as diversas cópias de CBH I presentes no genoma de *P. chrysosporium*. A identidade entre as sequências gênicas está demonstrada na tabela 1.

Tabela 1 - Similaridade (%) entre a sequência gênica codificadora dos domínios catalíticos (branco) e dos módulos de ligação aos carboidratos – CBM (cinza) das celobiohidrolases da família 7 de *P. chrysosporium* RP-78. Os valores entre parêntesis são os encontrados para a cepa K-3 por Suzuki et al. (2009).

	cel7A	cel7B	cel7C	cel7D	cel7E
cel7B	66 (67)		47 (66)	34 (66)	35 (63)
cel7C	73 (73)	68 (73)		73 (93)	67 (82)
cel7D	70 (71)	66 (71)	83 (83)		65 (81)
cel7E	70 (70)	65 (69)	81 (81)	81	

Fonte: Arquivo próprio.

Quando analisados a identidade entre os módulos de ligação aos carboidratos (CBM) as porcentagens encontradas são mais baixas do que o domínio catalítico. Essa diferença entre os CBMs pode estar correlacionada com a diferença entre a atividade de cada iso-enzima, visto que é a porção que reconhece o substrato durante a ação da enzima.

Trametes versicolor é outro fungo de degradação branca amplamente estudado, sendo conhecido por secretar celulasas, hemicelulasas e enzimas deslignificantes (TANAKA et al. 1999). A espécie apresenta grande capacidade de degradar simultaneamente todas as frações da biomassa lignificada, celulose, hemicelulose e lignina (ISROI et al., 2011). Devido a capacidade de atuar sobre biomassa lignificada, *T. versicolor* também tem sido explorado para atuar no biobranqueamento de polpa kraft, solubilizar carvão, destoxificar extratos de madeira e degradar polímeros sintéticos (SEDARATI et al., 2003).

Embora diversos genes codificadores de enzimas deslignificantes de *T. versicolor* tenham sido mais estudados (EVANS et al., 1994, JOHANSSON; NYMAN; CULLEN, 2002, TEERACHAT et al., 2012), muito pouco se sabe sobre suas enzimas responsáveis pela degradação de carboidratos (LAHJOUJI et al., 2007). O genoma desta espécie indica o potencial de produção de 40 celulasas das famílias GHs, sendo quatro celobiohidrolases GH7 e uma da família GH6 (FLOUDAS et al., 2012). Entretanto, esta espécie demanda mais estudos, visto que seu genoma abriga informação genética para codificar 453 CAZymes, sendo destas, 220 codificantes de GHs (RILEY et al., 2014).

Foi observado a ausência de CBM para todas as CBH I de *T. versicolor*. Apenas a CBH II do fungo possui CBM. Analisando o domínio organizacional das glicosil hidrolases da família 6 e 7 no banco de dados Pfam (<http://pfam.xfam.org/> - um compilado de dados genômicos disponíveis das famílias de proteínas) nota-se que a maioria das celulasas não possuem módulos de ligação ao carboidrato. No banco de dados do pfam podemos observar que das 717 sequências putativas ou identificadas de celobiohidrolases pertencentes à família GH7, apenas 94 sequências compreendem regiões homólogas ao CBM. Em geral, menos de 40 % das celulasas possuem CBM (VÁRNAI et al., 2013).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar glicosil hidrolases das famílias 6 e 7 provenientes dos basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* para aplicação em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos.

3.1 Objetivos específicos

- Obtenção de extratos enzimáticos ricos em GH6 e GH7 provenientes de cultivos dos fungos sobre celulose microcristalina
- Determinação do perfil proteico dos extratos enzimáticos ao longo do tempo e análise da expressão gênica de celobiohidrolases de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* através da técnica de *real-time* qPCR;
- Identificação das proteínas secretadas em cultivos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* por LC- MS/MS
- Resposta do potencial dos extratos enzimáticos dos fungos frente a ensaios de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos com diferentes características composicionais
- Produção e purificação de celobiohidrolases provenientes de *P. chrysosporium* e aplicação da enzima em conjunto com enzimas comerciais puras na sacarificação de materiais lignocelulósicos.
- Clonagem e expressão heteróloga dos genes que codificam as enzimas GH6 e GH7s de *P. chrysosporium*

4 ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS

A parte experimental desta tese está apresentada na forma de quatro capítulos que incluem uma pequena introdução, material e métodos, resultados e discussão e uma pequena conclusão sobre o trabalho desenvolvido no capítulo. Esses capítulos englobam o estudo da produção, identificação e aplicação de celobiohidrolases produzidas homologamente pelos fungos de podridão branca, *P. chrysosporium* e *T. versicolor*, além do estudo da expressão dessas proteínas em sistemas de expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans*.

O primeiro capítulo aborda a avaliação da secreção de enzimas durante o cultivo de dois fungos de podridão branca em meios simples com celulose microcristalina como fonte de carbono. O intuito desse trabalho foi o de acompanhar a produção de enzimas e atividade hidrolítica dos extratos ao longo do tempo e por fim, identificar as CAZy proteínas naturalmente secretadas por esses fungos no extrato que apresentou maior atividade hidrolítica.

O segundo capítulo descreve o emprego dos extratos com maior atividade hidrolítica (descritos no capítulo anterior) na hidrólise enzimática de medula de cana de açúcar, bagaço de cana de açúcar pré-tratado com sulfito alcalino e bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído. Neste trabalho, os extratos foram avaliados quanto a capacidade de sacarificação de materiais com diferentes características.

O terceiro capítulo descreve as etapas de purificação de uma celobiohidrolase de *P. chrysosporium* do extrato enzimático explorado nos capítulos 1 e 2. Além disso, apresenta a aplicação da enzima na composição de coquetel enzimático junto a outras enzimas puras comerciais em ensaios de hidrólise de materiais lignocelulósicos.

O quarto capítulo relata experimentos de identificação dos genes de celobiohidrolase das famílias GH6 e GH7 no genoma dos fungos, além da tentativa de clonagem e expressão heteróloga destas proteínas de basidiomicetos em *A. nidulans*.

CAPÍTULO 1:

Obtenção de um extrato enzimático rico em CBH e identificação das proteínas secretadas por *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* em cultivos induzidos com a presença de celulose microcristalina

1.1 INTRODUÇÃO

Fungos basidiomicetos apresentam a capacidade de produzir simultaneamente enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para degradar substratos lignocelulósicos. Muitos microrganismos são capazes de fazer a bioconversão desses substratos lignocelulósicos em compostos de fácil assimilação para o seu metabolismo, sendo que as enzimas hidrolíticas tem papel fundamental nessa bioconversão (VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2006). A maioria dos fungos de podridão branca produzem estas enzimas de forma a prover sua adaptação ao meio rico em ligninoceluloses (VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2006).

A conversão enzimática de celulose em glicose requer a ação sinérgica de um grupo de enzimas que são classificadas no banco de dados CAZy ("enzimas ativas sobre carboidratos") como glicosil hidrolases (GHs) e como enzimas auxiliares (AAs) (HENRISSAT, 1991; PAYNE et al., 2015). No grupo das GHs, as enzimas responsáveis pela desconstrução da celulose a glicose são as endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidades (BGL). As EGs hidrolisam, de forma randômica, ligações glicosídicas no interior da cadeia. As CBHs hidrolisam ligações glicosídicas nas extremidades das cadeias de celulose formando, principalmente, moléculas de celobiose. As BGLs atuam clivando a celobiose em duas moléculas de glicose (PAYNE et al., 2015).

As celobiohidrolases, em particular, são consideradas enzimas-chaves no processo de hidrólise, pois correspondem ao único grupo capaz de hidrolisar celulose cristalina de forma eficiente. As CBHs estão classificadas nas famílias das glicosil hidrolases 6 e 7, de acordo com a extremidade da cadeia de celulose que hidrolisam, redutora (GH7) e não redutora (GH6). Além disso, CBHs são as proteínas predominantemente secretadas pela maioria dos microrganismos produtores de celulasas, atingindo até 80% do total de proteínas secretadas por *T. reesei* (PAYNE et al., 2015).

O crescente número de genomas de basidiomicetos sequenciados disponíveis no portal Mycocosm do DOE Joint Genome Institute (JGI), 448 (junho de 2019) e a qualidade crescente dos genomas anotados irá aumentar o número de proteínas detectadas usando técnicas de secretômica (ALFARO et al., 2016). No trabalho de Wymelenberg et al., (2006) foi previsto, através de análises computacionais do banco de dados do genoma de *P. chrysosporium* v2.0, que o secretoma do fungo poderia conter até 769 proteínas, representando cerca de 7,7% das proteínas previstas em seu genoma total. Tendo isso em vista, o estudo de secretômica das proteínas de basidiomicetos se destaca para a identificação de enzimas em potencial, para propiciar melhorias no desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para degradação de lignocelulose (BARREIRO; GARCÍA-ESTRADA; MARTÍN, 2011). A identificação das proteínas ativas em carboidrato (CAZy) nestes secretomas pode levar à descoberta de novas enzimas responsáveis pela desconstrução da biomassa vegetal a açúcares monoméricos.

Neste contexto, o presente trabalho visa produzir e estudar a potencialidade de extratos ricos em CBHs, com o cultivo dos basidiomicetos *P. chrysosporium* e *T. versicolor* em celulose microcristalina. Para isso, foi investigada a produção de proteínas e atividade hidrolítica dos cultivos ao longo do tempo, além da identificação das proteínas extracelulares dos extratos que apresentaram maior expressão de CBH.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Cultivo de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* em celulose microcristalina (Avicel) para obtenção de extrato enzimático rico em CBH

1.2.1.1 Organismos e preparação de inóculo para os ensaios de produção de CBH

Os fungos de degradação branca utilizados neste trabalho foram *Phanerochaete chrysosporium* (RP-78) e *Trametes versicolor* (cepa originária das coleções de cultura Argentinas, Laboratorio de Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales - Profa. Laura Villalba) (LEVIN et al.,

2007). As cepas estão mantidas a 4 ± 2 °C, sem iluminação, em tubos de ensaio com meio contendo 2 % de extrato de malte, 0,2 % de extrato de levedura e 2 % de ágar contendo um cavaco de madeira.

A metodologia para preparação do inóculo de *P. chrysosporium* foi: placas de Petri contendo o mesmo meio de manutenção foram inoculadas com pequenos fragmentos provenientes dos fungos de estoque e incubadas a 37 ± 2 °C. Após o crescimento (cobertura total da placa) foi feita uma raspagem da superfície das placas para obtenção de esporos. Esses esporos foram condicionados em solução salina (NaCl a 0,9%). Foi determinada então a concentração de esporos na solução pela contagem em câmara de Neubauer. A carga de esporos no meio foi entre 10^4 - 10^5 esporos por litro de meio.

A preparação do inóculo de *T. versicolor* seguiu a seguinte metodologia: Placas de Petri contendo o mesmo meio de manutenção foram inoculadas com pequenos fragmentos provenientes dos fungos de estoque e incubadas a 27 ± 2 °C. Após atingir o crescimento desejado (cobertura total da placa), discos de 8 mm de diâmetro foram então inoculados em frascos Erlenmeyers contendo 200 mL de meio composto por 2,4 % de caldo de batata e 0,7% de extrato de levedura. O cultivo estático se desenvolveu por 15 dias a 27 ± 2 °C. O micélio obtido foi filtrado em funil de Buchner estéril e lavado com água esterilizada. Em um liquidificador com copo de aço inox (estéril), 300 mL de água destilada foram misturados à massa miceliana obtida e macerados com 3 pulsos de 15 segundos (com intervalos de 45 segundos para evitar o aquecimento). Para calcular a quantidade de micélio na suspensão, foi feita a determinação da massa seca de fungo presente em uma alíquota. A carga de inóculo nos ensaios foi de 500 mg/L de meio.

1.2.1.2 Ensaios de produção de CBH utilizando Avicel como substrato e obtenção dos extratos enzimáticos

Os ensaios para obtenção de extratos enriquecidos em CBH foram conduzidos em Erlenmeyers de 1L com 300 mL de meio Norkrans modificado (ERIKSSON; JOHNSRUD; FOREST, 1983). O meio consistiu dos seguintes nutrientes por litro de solução: KH_2PO_4 , 0,6 g; K_2HPO_4 , 0,4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 74 mg; citrato de ferro, 12 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6,6 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 5

mg; $\text{CoC}_{12.6}\text{H}_{20}$, 1 mg; $\text{CuSO}_{4.5}\text{H}_{20}$, 1 mg; tiamina, 0.1 mg; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 5,33 g; uréia, 0,75 g. Avicel (2%) e 0,2% de Bacto-peptona foram adicionadas ao meio e o pH ajustado para o intervalo de 4,6 a 5,0. Foram realizados cultivos controle, com a glicose como fonte de carbono.

O cultivo foi realizado em agitador orbital, com 150 rotações por minuto, a 27 °C para *T. versicolor* e 37 °C para *P. chrysosporium*. Foram retiradas amostras com 5, 8 e 12 dias de cultivo. O micélio e o restante de avicel foram separados da fração líquida através da filtração utilizando uma malha sintética de 200 mesh. O micélio obtido foi congelado em nitrogênio líquido para análise da expressão de genes relacionados à síntese de CBHs.

Os extratos de proteínas obtidos dos cultivos foram concentrados em dispositivo de ultrafiltração (Amicon – Millipore) a 10°C utilizando membrana PES com corte nominal de 10kDa (Millipore). Os extratos concentrados de proteínas dos cultivos com avicel foram armazenados em Ultrafreezer a - 80°C, sendo posteriormente submetidos à liofilização. Os extratos liofilizados foram estocados em freezer a -20 °C.

1.2.2 Análise dos extratos fúngicos através de gel SDS-PAGE

Uma alíquota dos extratos concentrados dos cultivos com avicel e com glicose foi avaliada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida SDS PAGE. Os extratos concentrados de proteínas foram avaliados quando ao teor de proteínas pelo método de Bradford (1976). Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços onde em cada poço foram misturados 10 µL de extrato de proteínas, 40 µL de reagente de Bradford (Bio-Rad) e 150 µL de água. Após 5 minutos as soluções tiveram as absorbâncias medidas a 595 nm em espectrofotômetro (Tecan NanoQuant infinite M200 pro). Os cálculos foram feitos com base na equação da reta obtida a partir da curva padrão com albumina de soro bovino.

As proteínas presentes no extrato dos cultivos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* foram então avaliadas em eletroforese SDS PAGE realizada a 140 V em gel com 12% de poliacrilamida. O tampão de preparação de amostra utilizado foi Laemmli sample buffer (BioRad) composto de 62,5 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 25% de glicerol, 0,01% de azul de Bromofenol (pH 6.8), adicionado de 5% de 2-

mercaptoetanol. A amostra dissolvida no tampão foi fervida por 5 min antes da aplicação no gel. Cada canaleta do gel foi carregado com um volume de amostra suficiente para uma carga de 10 µg de proteína. Os extratos dos cultivos em glicose foram também concentrados, e a canaleta foi carregada com o máximo volume (30 µL), visto que o extrato concentrado não atingiu 10 µg de proteína. O padrão de massa molar de 10 – 250 kDa (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, Bio – Rad) foi utilizado como referência para comparação das massas molares das bandas proteicas reveladas com solução de Comassie blue.

1.2.3 Análise da expressão gênica de celobiohidrolases por PCR quantitativo em tempo real (“real-time qPCR”)

1.2.3.1 Construção dos iniciadores de reação (primers)

Os primers de GH7 de *T. versicolor* foram desenhados através da análise das regiões não codificantes dos genes (UTRs) seguindo o método estabelecido por Suzuki, Igarashi e Samejima (2009) na análise da expressão de celobiohidrolases. Os primers para amplificação de GH6 foram desenhados dentro da região codificante do gene. Os primers de *P. chrysosporium* utilizados neste trabalho foram os mesmos utilizados por Suzuki, Igarashi e Samejima (2009). Utilizou-se o gene da actina como controle endógeno.

1.2.3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para extração do RNA o micélio congelado de cada dia de cultivo (5, 8 e 12) foi macerado em cadinho de porcelana e pistilo na presença de nitrogênio líquido. A extração do RNA foi feita através do kit comercial illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation Kit de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase para eliminação de DNA genômico (DNAg). A digestão do DNAg foi feita utilizando 8 µL de amostra de RNA (800 ng), 1 µL de tampão (contendo 400mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM MgSO₄ e 10mM CaCl₂) e 1 µL de enzima DNase (Promega). A reação foi incubada a 37 °C por 45 min. Após isso, foi adicionado 1 µL de solução DNase Stop (20mM EGTA - pH 8.0) para parada da reação e novamente incubado a 65 °C por 10 min para

desnaturação da enzima. As amostras de RNA tratadas com DNase foram utilizadas como molde para síntese de cDNA.

Para a reação de transcrição reversa para cDNA foi utilizado 5 µL de amostra de RNA e 8 µL de mix 1 (1 µL de oligo (DT)₁₂₋₁₈ (500 µg/mL), 1 µL de dNTP 10 mM, 6 µL de H₂O). Essa mistura foi incubada a 65 °C por 5 min para desenovelamento do RNA. No tubo foi então adicionado 7 µL de mix 2 (4 µL de tampão 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 1 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de H₂O e 1 µL de SuperScript™ III Reverse Transcriptase). A reação foi incubada a 55 °C por 1 hora e depois a 70 °C por 15 min.

1.2.3.3 Reação de real-time qPCR para detecção da expressão gênica

As reações para cada gene foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real contendo: 2,5 µL de cDNA (diluído 25 vezes), 5 µL do tampão Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mixes (Life Technologies™), 0,4 µL do primer forward (100 mM) , 0,4 µL de primer reverse (100 mM), 11,7 µL de H₂O. Cada reação de PCR foi realizada em triplicada técnica. As condições da reação foram 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As análises foram realizadas em placas de 96 poços através do 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies™). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação.

O nível de expressão relativo foi determinado comparando o nível de expressão dos genes alvo e do gene de referência pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001). A quantificação da expressão dos genes foi feita de forma relativa, isto é, pela comparação da expressão em um grupo controle.

1.2.4 Atividade em papel de filtro (FPase) dos extratos fúngicos

As atividades de FPase foram determinadas nos extratos enzimáticos concentrados como modo de medir a atividade hidrolítica dos extratos ao longo do período de cultivo dos fungos. A atividade de FPase foi determinada segundo a

metodologia descrita por Ghose (1987). Essa metodologia determina a preparação de diluições da amostra enzimática a ser analisada, sendo necessário que no mínimo duas dessas diluições apresentem uma liberação acima e abaixo de 2,0 mg de açúcares redutores.

A reação enzimática foi conduzida com 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, uma tira de papel de Whatman N° 1 de 1 x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático. As misturas foram aquecidas em banho a 50°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3,0 mL de DNS, sendo a mistura posteriormente fervida por 5 minutos (MILLER, 1959). Posteriormente, foram adicionados 20 mL de água destilada a cada tubo, seguido de agitação. Os controles para cada amostra foram feitos adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático.

Os valores de absorbância foram lidos a 540 nm e convertidos a glicose através de uma curva de calibração. Um gráfico foi feito relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2,0 mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulasas totais do extrato FPU.mL⁻¹.

$$FPU = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima para liberação de 2,0 mg de AR}} (UI. ml^{-1})$$

1.2.5 Identificação das proteínas presentes nos extratos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC - MS / MS)

As análises das proteínas presentes nos extratos dos fungos foram realizadas pela equipe de Proteômica do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), parte da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

1.2.5.1 Preparação e tratamento das amostras para análise de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Os extratos liofilizados dos fungos foram ressuspensos para análise de secretômica. Os extratos concentrados de proteínas foram avaliados quanto ao teor de proteínas pelo método de Bradford (1976). As proteínas presentes no extrato dos cultivos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* foram então submetidas a eletroforese SDS PAGE realizada a 140 V em gel com 12% de poliacrilamida. A carga total de proteína de cada amostra de extrato foi de 30 µg. Para a análise da secretômica, o gel foi seccionado em 5 frações ao longo do padrão de massa molar. Cada fração foi colocada em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL cobrindo totalmente as frações com uma solução 50/50 (v/v) água: metanol, contendo 0,1% de ácido fórmico.

As frações do gel foram enviadas para o serviço de análise do secretoma que foi conduzida conforme metodologia descrita a seguir. As frações de gel contendo as proteínas foram submetidas à etapa de digestão. Para digestão das proteínas, cada fração de gel foi cortada em pedaços menores e recebeu a adição de 100 µL de solução de bicarbonato de amônio/acetonitrila 100 mM (1: 1, v / v) e as amostras foram incubadas por 30 min. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. Foi então adicionado 500 µL de acetonitrila ao pellet e incubou-se à temperatura ambiente, com ocasionais misturas em vórtex até os pedaços de gel ficarem brancos e encolherem. Em seguida, a acetonitrila foi removida e os pedaços de gel foram secos. Foram adicionados, ao passo de redução, 100 µL de 10 mM de DTT (DL-Ditiotreitol (em bicarbonato de amônio 100 mM) e as amostras foram incubadas a 56 ° C durante 30 minutos, com vórtex ocasional. Após isso, as suspensões foram centrifugadas a 10000 rpm e o sobrenadante foi descartado e os pedaços de gel foram secos. No passo de alquilação, adicionou-se ao gel seco 100 µL de solução de iodoacetamida (em água 55 mM) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois foi centrifugado a 10000 rpm e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e os pedaços de gel foram secos. Foi então adicionada a solução de tripsina (13 ng µL⁻¹) em bicarbonato de amônio (50 mM) para cobrir os pedaços de gel. As amostras foram incubadas a 37 °C *overnight*. Usando um pipetador recuperou-se o sobrenadante e transferiu-se para um novo tubo de microcentrifuga. Para recuperar os peptídeos de proteínas de baixa abundância, adicionou-se 100 µL de solução de bicarbonato de amônio / acetonitrila 100 mM (1: 2, v / v) para cobrir as fatias de gel remanescente. Essas amostras foram incubadas durante 15

min à temperatura ambiente. A solução de extração foi transferida para um tubo de microcentrífuga com o sobrenadante de digestão recuperado anteriormente.

1.2.5.2 Condições utilizadas nas análises de Nano LC – MS/MS

Na separação dos peptídeos por cromatografia líquida (LC), inicialmente, 5 µl da amostra de peptídeos foram retidos numa coluna Symmetry C18: 5 µm x 180 µm x 20 mm (Waters, Corp., Milford, EUA) e eluídos, em linha, para a coluna HSS T3: 1,8 µm x 75 µm x 100 coluna mm (Waters, Corp., Milford, EUA), utilizando um gradiente binário de 7 a 85% de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, durante 73 min, a um fluxo de 400 nL.min⁻¹.

A aquisição de espectrometria de massa foi feita em um espectrômetro de massa QEF XEVO G2 Xs equipado com uma fonte de "nanolockspray" no íon positivo (Waters, Corp., Milford, EUA). Os fragmentos MS / MS do GFP [Glu 1] - Fibrinopeptídeo B com um íon de carga dupla $[M + 2H]^2+$ = 785,84206 m / z (Waters, Corp., Milford, EUA) foram usados como massa de bloqueio para obter a calibração final do instrumento. Experiências de varredura independente de dados (MSE) foram realizadas trocando-se entre energias de colisão baixas (3 eV) e altas (15-50 eV) aplicadas à célula de armadilha "onda T" preenchida com argônio. O tempo de varredura de 0,5 s foi usado para varreduras de baixa e alta energia de m / z 50 a 2000.

1.2.5.3 Processamento dos dados brutos gerados pela análise Nano LC – MS/MS

O processamento de dados brutos para a identificação de proteínas foi feito através do *software* Progenesis Q1 para proteômica 4.0 (Nonlinear Dynamics). Os parâmetros de processamento incluíram um modo automático para resolução MS-TOF e largura do pico cromatográfico. Os limiares de detecção de energia baixa e elevada foram otimizados pelo software. A janela de massa de bloqueio foi definida como automática, para calibração do instrumento antes da análise.

Os parâmetros de análises definidos foram: Mínimo de 3 fragmentos pareados por peptídeo, mínimo de 5 fragmentos pareados por proteína, mínimo de 1 peptídeo único combinado por proteína, 1 possível clivagem falhada por tripsina, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável, e uma taxa máxima de descoberta positiva falsa (FDR)

no modo automático. No modo automático, a foi determinada com base na busca de um banco de dados reverso, gerado automaticamente pelo programa Progenesis Q1 para proteômica 4.0, invertendo a sequência de cada entrada. Todos os acertos de proteína foram identificados com uma confiança > 95%.

As análises dos peptídeos foram realizadas contra os bancos de dados das espécies avaliadas, obtidos no portal Mycocosm do DOE Joint Genome Institute (JGI), sendo as versões utilizadas:

- *P. chrysosporium* v2.2 (<http://genome.jgi.doe.gov/Phchr2/Phchr2.home.html>)
- *T. versicolor* v 1.0 (<https://genome.jgi.doe.gov/Trave1/Trave1.home.html>)

1.2.5.4 Identificação e anotação das proteínas detectadas por LC – MS/MS

Os resultados após o processamento dos dados brutos da análise em LC-MS/MS foram recebidos em forma de planilhas que continham o número de acesso identificado pelo *software* Progenesis Q1 para proteômica 4.0, contra o banco de dados genômico dos fungos no JGI.

A primeira etapa para determinação da identificação das proteínas foi a consulta direta dos números de acesso no genoma do fungo. A anotação presente no banco foi utilizada para classificação prévia e identificação de CAZy proteínas. Para confirmação da função putativa da proteína, a sequência proteica foi analisada no banco de dados do NCBI por BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Além disso, a sequência da proteína foi analisada quanto a presença de peptídeo sinal de secreção empregando o SignalP 4.1, disponível *on line* em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (PETERSEN et al., 2011). Caso esse fosse negativo, era analisado então se a proteína era oriunda de sistemas não-clássicos de secreção, empregando o programa Secretome P disponível *on line* <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>. (BENDTSEN et al., 2004) Foram estimadas características das proteínas, como pI e massa molar teóricos, através da ferramenta no portal de bioinformática de proteínas ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Avaliação da produção das CBHs nos extratos enzimáticos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* através da técnica de SDS-PAGE e quantificação da expressão gênica

Com o objetivo de obter extratos enzimáticos ricos em CBH foram conduzidos experimentos utilizando dois basidiomicetos de decomposição branca e Avicel como fonte de carbono e de indução da produção dessas enzimas. A análise das principais proteínas extracelulares produzidas nos cultivos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* foi realizada através de uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS PAGE), com o intuito de observar a presença de bandas representativas de celobiohidrolases (Figura 1.1 e Figura 1.3). Os mesmos cultivos tiveram os micélios separados e avaliados quanto a expressão gênica das cópias dos genes responsáveis pela síntese de CBHs descritos para cada fungo. Os códigos de acesso de cada gene de CBH presente no genoma desses fungos estão detalhadas no apêndice A dessa tese, nas tabelas A1 e A2.

As celulases de *P. chrysosporium* possuem transcrição diferenciada, dependendo do substrato e do estágio de cultivo. No trabalho de Suzuki, Igarashi e Samejima (2010) foi observado que a transcrição de cel7A, cel7B e cel7E não foi afetada pelos celooligossacarídeos testados, que induziram fortemente a expressão dos outros genes de celobiohidrolase. Essa análise foi feita através de *real-time* qPCR visando quantificar a isoenzima mais induzida pelo avicel (Figura 1.2 e Figura 1.4). Sabe-se que as diferentes cópias gênicas sofrem diferentes induções de acordo com o substrato utilizado.

O perfil de secreção de proteínas nos extratos concentrados de *P. chrysosporium* pode ser visto na fotografia dos géis de poliacrilamida (Figura 1.1). Em todos os extratos (5, 8 e 12 dias de cultivo) foram observadas bandas mais intensas em torno de 55 kDa, valor esperado para as celobiohidrolases desse fungo (MARTINEZ et al., 2004). Pode-se também observar que os cultivos controles com glicose não mostram essa banda intensa, além de apresentarem número e concentração de proteínas significativamente menores.

Figura 1.1 – Fotografias dos géis de proteínas (SDS-PAGE) dos extratos concentrados dos cultivos de *P. chrysosporium* em avicel. A primeira coluna corresponde ao marcador molecular (MM), a segunda ao cultivo controle com glicose e a terceira ao extrato concentrado. As bandas mais intensas das celobiohidrolases estão indicadas por uma seta.

Fonte: Arquivo próprio.

Pode ser observado que com o aumento do tempo de cultivo foi observado um aumento na banda correspondente as CBHs. Contudo também pode ser observado um aumento na secreção de outras proteínas nos períodos de 8 e 12 dias de cultivo em relação a 5 dias.

Na análise de expressão de celobiohidrolases de *P. chrysosporium* foram investigados os genes de 5 CBHs I (Cel7 A, B, C, D e E -GHs7) e 1 CBHII Phcry_Cel6 (GH6) e utilizados os primers desenhados por Suzuki, Igarashi e Samejima (2009) para realização das reações de *real-time* qPCR. Os primers utilizados e o tamanho dos amplicons da reação estão detalhados nas tabelas B1 e B2 no apêndice B da tese. Não foi possível obter a expressão das cópias A e B das GH7. A Figura 1.2 mostra o perfil de expressão gênica das celobiohidrolases ao longo do cultivo do fungo em avicel.

Figura 1.2 – Quantificação relativa (QR) da expressão gênica de celobiohidrolases de *P. chrysosporium* ao longo do tempo de cultivo em avicel.

Fonte: Arquivo próprio.

Os resultados da análise da expressão dos genes de *P. chrysosporium* mostra que um maior nível de expressão dos genes de celobiohidrolase foi observado em 8 dias de cultivo. O perfil de expressão mostra que um aumento drástico entre as amostras de 5 e 8 dias e a queda de expressão dos genes em 12 dias de cultivo. O perfil condiz com a cinética de crescimento do fungo sobre um substrato simples, já que no 12 ° dia de cultivo foi observado que o substrato já estava quase totalmente consumido, acarretando a diminuição da liberação de compostos indutores da transcrição desses genes. A produção de CBHs também é induzida na presença de celulose (KOLBE; KUBICEK, 1990), mesmo que a celulose seja um polímero insolúvel e não ser diretamente reconhecida pelo metabolismo fúngico. Pesquisadores investigaram este fato e postularam que compostos de baixa massa molar derivados da celulose induzem a produção eficiente de CBHs (revisado por SUTO; TOMITA, 2001).

Os genes da CBHI (Cel7D) e da CBHII (Cel6) foram expressos em níveis altos e substancialmente superiores aos observados para as outras duas celobiohidrolases I. As duas outras cópias de GH7 tiveram uma magnitude menor na expressão de seus genes. Esses resultados vão de acordo com o observado na literatura, que mostra que o gene cel7D é conhecido por ser o gene de celobiohidrolase mais altamente expresso numa cultura de *P. chrysosporium* sobre celulose (WYMELENBERG et al., 1993).

O alto nível de expressão das enzimas pode ser observado no aumento da banda do gel que representa as celobiohidrolases, já que no extrato de 12 dias é onde aparece a maior intensidade da banda, tempo em que o transcrito já foi traduzido na proteína e secretado para o meio extracelular. Os transcritos de cel7D também foram os mais abundantes nos estudos já reportados por Suzuki, Igarashi e Samejima (2010), enquanto os transcritos de cel7A e de cel7B foram expressos em níveis constitutivamente baixos.

O perfil de secreção de proteínas nos extratos concentrados de *T. versicolor* pode ser visto na fotografia dos géis de poliácridamida (Figura 1.3). Em todos os extratos (5, 8 e 12 dias de cultivo), foram observadas bandas em torno de 50 kDa, valor esperado para as celobiohidrolases desse fungo (FLOUDAS et al., 2012). Os extratos dos cultivos em glicose mostram um perfil menor de proteínas secretadas.

Figura 1.3 - Fotografias dos géis de proteínas (SDS-PAGE) dos extratos concentrados dos cultivos de *T. versicolor* em avicel. A primeira coluna corresponde ao marcador molecular (MM), a segunda ao cultivo controle com glicose e a terceira ao extrato concentrado. As bandas mais intensas das celobiohidrolases estão indicadas por uma seta.

Fonte: Arquivo próprio.

Foram desenhados primers para 5 cópias de genes responsáveis pela síntese de CBHs presente no genoma de *T. versicolor*, sendo 4 CBH I (GH7) e uma CBH II (GH6). Para o desenho dos primers para as celobiohidrolases da família GH7 foi utilizada a metodologia de Suzuki, Igarashi e Samejima (2009), que posiciona os primers na proximidade ou internamente à 3' UTR da sequência

gênica, a fim de obter a detecção de cada cópia gênica visto que as sequências codificantes de celobiohidrolases são extremamente conservadas. Os primers desenhados para *T. versicolor* e utilizados nessas análises estão detalhados no apêndice B desta tese. Com esses primers, foi possível obter a análise da expressão do gene GH7C, uma CBHI e o gene GH6, uma CBHII. A expressão destes genes está demonstrada na figura 1.4.

Figura 1.4 Quantificação relativa (QR) da expressão gênica de celobiohidrolases de *T. versicolor* ao longo do tempo de cultivo em avicel.

Fonte: Arquivo próprio.

O perfil da expressão dos genes foi semelhante ao observado em *P. chrysosporium*, onde houve uma crescente expressão entre 5 e 8 dias de cultivo, sendo que no 8º dia houve o maior nível de expressão dos genes e uma queda brusca observada no cultivo de 12 dias, mostrando também que o tempo de cultivo do fungo sobre avicel levou a uma diminuição da indução da transcrição dessas enzimas. Esse padrão pode ser observado através da intensidade da banda de celobiohidrolase vista no gel de proteína. O gene da CBH I foi mais expresso que CBH II. Os valores observados para *T. versicolor* foram menores que os observados para *P. chrysosporium*. Do ponto de vista molecular, não há trabalhos na literatura que quantificam a expressão gênica de celulasas de *T. versicolor*. Esse fungo é mais intensivamente estudado para produção de enzimas oxidativas e nas etapas de biopolpação. (BLANCHETE et al., 1988, COUTO et al., 2002, LORENZO et al., 2012, SINGH et al., 2013).

1.3.2 Avaliação da atividade hidrolítica (FPase) dos extratos enzimáticos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor*

Para complementar a informação obtida com a análise de proteínas em gel SDS-PAGE foi realizada a quantificação da atividade desses extratos empregando papel de filtro como substrato (atividades FPase) (Ghose, 1987). Os ensaios também foram realizados com a complementação do extrato com β -glicosidases a fim de evitar o acúmulo de celobiose que poderia inibir a ação das CBHs que estão sendo determinadas.

Na tabela 1.1 estão os dados de atividade do extrato enzimático de *P. chrysosporium*. Foi observado que a atividade FPase aumentou progressivamente ao longo dos dias de cultivo, atingindo 4 FPU/mL no extrato de 12 dias.

Tabela 1.1 - Atividade em papel de filtro (FPU) dos extratos de *P. chrysosporium* puro e com suplementação de β -glicosidase. A atividade foi medida nos extratos de 5, 8 e 12 dias de cultivo em avicel nos extratos concentrados. A atividade do extrato bruto original foi calculada em relação a taxa de concentração de cada extrato.

Tempo de cultivo	FPU/mL de extrato concentrado		taxa de concentração do extrato	FPU/mL de extrato original	
	Extrato puro	Extrato suplementado		Extrato puro	Extrato suplementado
5 dias	0,41	0,49	30	0,014	0,016
8 dias	3,06	3,20	25	0,122	0,128
12 dias	4,12	6,23	17	0,242	0,370

Fonte: Arquivo próprio.

Para todos os extratos foi observado um aumento na atividade quando acrescentadas β -glicosidases, que pode ser um indicativo de um extrato rico em CBH com deficiência de β -glicosidase oriunda do fungo. Isso pode ser mais bem observado no extrato de 12 dias, onde é observada uma maior contribuição da suplementação com β -glicosidases.

Como a determinação de atividade foi realizada nos extratos concentrados e a taxa de concentração de cada extrato foi diferente, foi feito o cálculo de FPU por mL de extrato original sem concentração. Foi observado um aumento de cerca de 8 vezes entre 5 e 8 dias na atividade hidrolítica e um aumento de 2 vezes entre 8 e 12 dias de cultivo. Esses valores podem ser relacionados com a intensidade

das bandas observadas nos géis de eletroforese, pois as bandas atribuídas às CBHs foram mais pronunciadas em 8 e 12 dias de cultivo.

A Tabela 1.2 apresenta as atividades dos extratos de *T. versicolor* com e sem suplementação de β -glicosidase. Os extratos de *T. versicolor* apresentaram valores abaixo dos encontrados para os extratos de *P. chrysosporium*, atingindo 1,2 FPU/mL de extrato concentrado em 12 dias de cultivo.

Tabela 1.2 - Atividade em papel de filtro (FPU) dos extratos de *T. versicolor* puro e com suplementação de β -glicosidase. A atividade foi medida nos extratos de 5, 8 e 12 dias de cultivo em avicel nos extratos concentrados. A atividade do extrato bruto original foi calculada em relação a taxa de concentração de cada extrato.

Tempo de cultivo	FPU/mL de extrato concentrado		taxa de concentração do extrato	FPU/mL de extrato original	
	Extrato puro	Extrato suplementado		Extrato puro	Extrato suplementado
5 dias	0,73	0,88	35	0,021	0,025
8 dias	0,58	1,17	25	0,023	0,047
12 dias	1,19	1,82	20	0,059	0,091

Fonte: Arquivo próprio.

A suplementação com β -glicosidase acarretou aumento na atividade de todos os extratos e apresentou maiores impactos no extrato de 8 dias, ocasionando uma atividade de 2 vezes a atividade do extrato sem suplementação. Os valores observados para a atividade do extrato original demonstraram que os extratos de 5 e 8 dias apresentaram valores semelhantes, ocorrendo um aumento de cerca de 2 vezes desse valor no extrato de 12 dias.

Como observado para ambos fungos, o extrato enzimático de 12 dias de cultivo foi o que apresentou maior atividade hidrolítica e por essa razão foi escolhido para a identificação das proteínas presentes através da análise secretômica por LC MS/MS.

1.3.3 Análise das proteínas secretas por basidiomicetos em celulose microcristalina identificadas por análise de LC MS/MS

As análises dos secretomas foram realizadas com o intuito de identificar as proteínas induzidas nos basidiomicetos em estudo pela presença do avicel como fonte de carbono. Esta análise permite conhecer a composição do extrato enzimático dos fungos para melhor compreensão da atividade sinérgica das suas enzimas na degradação dos materiais lignocelulósicos para futura investigação do potencial desses extratos na sacarificação de materiais lignocelulósicos.

Os resultados do secretoma em relação a abundância de proteínas é dado na forma de abundância normalizada e decorre da quantidade de íons detectada no sistema de espectrometria de massas. Os dados de abundância normalizada originais foram divididos por 10.000 simplesmente para indicarem números de menor magnitude e tratados como “abundância relativa”.

Todas as proteínas dos extratos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor*, detectadas pelas análises de LC MS/MS e identificadas por ferramentas de bioinformática foram compiladas nas Tabelas C1 e C2 apresentadas no Apêndice C, juntamente com o número de acesso da proteína no JGI, a anotação da função, os domínios CAZy, a massa molar estimada sem glicosilações, o pI calculado e informações de predição de secreção, se a proteína é secretada devido ao peptídeo sinal ou se passa por uma via de secreção não-clássica.

1.3.1.1 Análise do secretoma de *P. chrysosporium* em celulose microcristalina

O genoma de *P. chrysosporium* foi sequenciado por Martinez et al. (2004) e seu secretoma é o mais amplamente estudado no grupo dos basidiomicetos. Alguns exemplos de fontes de carbono ou indutores que foram estudados incluem celulose purificada, xilana, amido ou lignina sintética, madeira ou materiais lignocelulósicos (ABBAs et al., 2005; ADAV et al., 2012, HORI et al., 2011, RAVALASON et al., 2008, WYMELENBERG et al., 2006, 2010).

No presente trabalho foram identificadas 56 proteínas no extrato enzimático de *P. chrysosporium* cultivado em avicel. Essas proteínas estão divididas em dez grupos de acordo com a sua função biológica no metabolismo do fungo e a

quantidade de enzimas diferentes detectadas em cada um dos 10 grupos está detalhada na Figura 1.5.

Figura 1.5 - Quantidade de proteínas detectadas no extrato de *P. chrysosporium* cultivado em celulose microcristalina separadas por suas funções biológicas.

Fonte: Arquivo próprio.

O grupo de enzimas que degradam a hemicelulose foi aquele com o maior número de representantes no secretoma de *P. chrysosporium*, com 11 proteínas detectadas. Em seguida, proteínas que fazem a degradação da celulose corresponderam a um total de 9, as oxidorreduções e as proteínas hipotéticas mostraram o mesmo número de proteínas (8). O secretoma mostrou ainda 8 esterases, 5 enzimas envolvidas na degradação da parede celular de fungos, 2 envolvidas na degradação de pectina e 2 de amido, além de 1 protease e enzimas com outras funções biológicas (4).

Quando analisada a distribuição da abundância dessas proteínas nos extratos através da abundância relativa (figura 1.6) podemos ver que a distribuição dos grupos não se reflete na quantidade do número de proteínas de cada grupo funcional. O grupo das celulases representa o maior grupo em abundância relativa, representando 48 % do secretoma. As enzimas que degradam a hemicelulose foram o segundo grupo mais abundante com 16 %, seguido das enzimas que estão relacionadas a degradação da parede celular de fungos, 13 %.

Figura 1.6 - Distribuição da abundância relativa de cada grupo biológico de proteínas detectadas nos cultivos de *P. chrysosporium*. A abundância apresentada é derivada da abundância normalizada proveniente da análise por LC MS/MS dos extratos proteicos.

Fonte: Arquivo próprio.

Tanto na quantificação do número de proteínas como na sua abundância relativa pode ser observada a predominância de proteínas relacionadas, em algum nível, à degradação de frações encontradas na biomassa vegetal. Essas proteínas identificadas foram subsequentemente avaliadas quanto a sua classificação no banco de dados de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZy) (LOMBARD et al., 2014). Do total de 56 proteínas identificadas, 41 do extrato de *P. chrysosporium* podem ser classificadas no CAZy. Desse total, 29 foram classificadas no grupo das glicosil hidrolases (GH), sete no grupo de enzimas que possuem atividades auxiliares (AA) e cinco proteínas com atividade de carboidrato esterases (CE). Além de mais numerosas, as glicosil hidrolases foram as CAZy proteínas mais abundantes no secretoma de *P. chrysosporium*. A abundância de cada grupo de CAZy proteína está apresentada na Figura 1.7. Elas estão inseridas dentro dos grupos funcionais que degradam a celulose (5), hemicelulose (5), degradação de amido (2), pectina (1), parede celular de fungos (3) e proteínas hipotéticas contendo domínio de GH (1).

Figura 1.7 – Abundância relativa de cada família CAZy detectada no extrato de *P. chrysosporium*. A abundância apresentada é derivada da abundância normalizada proveniente da análise por LC MS/MS dos extratos proteicos. Em parenteses, o número de proteínas encontradas para cada família.

Fonte: Arquivo próprio.

De forma geral, as quantidades relativas das CAZy proteínas presentes no extrato de *P. chrysosporium* nos leva ao entendimento que houve uma superexpressão das GHs relacionadas com a degradação de celulose e hemicelulose nos cultivos contendo avicel como fonte de carbono.

A análise detalhada da Figura 1.7 mostrou nove enzimas relacionadas à degradação da celulose: quatro endoglucanases (duas GH5, uma GH12 e uma GH45), apresentando ao total 12 % da abundância total dentre as CAZymes, sendo a mais abundante as EG da família 5. Uma celobiohidrolase II (GH6) e quatro celobiohidrolases I (GH7) fazem parte das CBHs e representaram cerca de 62 % das celulases. Nenhuma β -glicosidase foi detectada nas análises de LC MS/MS de *P. chrysosporium*. Um dos motivos que pode explicar a ausência de uma enzima importante do sistema celulolítico no secretoma do fungo foi descrito em um trabalho de Tsukada et al. (2006). Os autores demonstraram que *P. chrysosporium* apresenta β -glicosidase intracelular (BGL- GH1) capaz de converter oligossacarídeos pequenos e não produz BGL extracelular (BGL-GH3).

A família GH7 foi a família que apresentou o maior valor de abundância relativa (364), que representa cerca de 40 % dentre todas as CAZymes que foram detectadas no secretoma. CBH I Cel7D (ID JGI 137372) foi a proteína mais secretada no extrato de *P. chrysosporium*, apresentando um valor de abundância relativa de 295. Esse valor representa 80 % das GH7s presentes no extrato. Além disso, sozinha, Cel7D representa 32 % das CAZymes encontradas no extrato. Por fim, em relação ao total das proteínas secretadas, essa proteína representa cerca de 29 % na abundância total somada das proteínas encontradas. Esses resultados encontrados na secretômica vão de acordo com a literatura, onde foi visto que a celobiohidrolase I *PchCel* 7D foi descrita como a celulase mais secretada pelo fungo *P. chrysosporium*, constituindo aproximadamente 10 % do total de proteínas produzidas extracelularmente em cultivos sobre a celulose durante a fermentação submersa (MUÑOZ et al., 2001).

As outras isoenzimas de CBH (GH7) presentes no secretoma foram as Cel7C (JGI 2971601), com um valor alto de abundância (54), e as outras duas CBHs, em menor abundância no extrato, Cel7E (JGI 3024803) (10) e Cel7F/G (JGI 2976245/2976248) (4). Esses resultados são consistentes com outros estudos de *P. chrysosporium* em meios contendo celulose (Uzcategui et al., 1991c), que identificaram as isoenzimas CBH1 correspondentes a cel7C (notação antiga usada:

CBH62) e cel7D (notação antiga usada: CBH58), as duas com grande abundância no secretoma do fungo como foi descrito com os resultados do nosso trabalho.

As isoenzimas Cel7A e Cel7B em geral, como demonstrado em trabalhos que avaliaram o perfil da expressão desses genes sob influência de diversos compostos indutores, não aparecem em conjunto com as outras proteínas dessa família. No trabalho de Suzuki, Igarashi e Samejima (2010) é levantada a hipótese de que possivelmente Cel7A e Cel7B não participem da degradação da celulose, porque sua expressão gênica foi apenas ligeiramente alterada durante o cultivo com celulose, enquanto outros genes dessa família mostraram mudanças notáveis. Além disso, modelos de homologia da estrutura tridimensional de Cel7s mostraram várias diferenças estruturais nas alças formadoras de túnel; Cel7A e Cel7B exibem uma estrutura semelhante à endoglucanase, mas as quatro outras Cel7s são muito semelhantes e podem não mostrar diferenças funcionais marcantes (MUÑOZ et al., 2001). Assim, espera-se que Cel7A, Cel7B e Cel7E tenham papéis caracteristicamente diferentes das outras Cel7s na degradação de celulose.

As enzimas de degradação da hemicelulose representam o segundo maior grupo de proteínas identificadas no secretoma de *P. chrysosporium*. Nesse grupo foram identificadas onze proteínas, sendo cinco caracterizadas com atividade de endoxilanases (quatro proteínas da família GH10 e uma da família GH11), duas mananases (GH5_subfamília 7), uma arabinanase e uma β -xilosidase, ambas pertencentes a família GH43 e duas xiloglucanases (GH74). As endoxilanases foram as enzimas que apresentaram maior abundância do grupo, representando 15 % das CAZymes.

Algumas CAZY enzimas estão relacionadas à síntese e degradação da parede celular do fungo e à produção da matriz extracelular polissacarídica desses fungos (AO; FREE, 2017). Foram encontradas no extrato 3 glicosil hidrolases relacionadas com essa atividade e classificadas dentro desse grupo de enzimas. Vale destacar a presença de uma glucanase da família GH55 (glucan 1,3- β -glicosidase), que apresentou um alto valor de abundância (82). Nesse grupo também aparece uma glucanase da família GH131 (glucanase com ampla atividade, com atividades para clivar ligações glicosídicas dos tipos; β -1-3, β 1-6 e β -1,4), além de uma quitinase (GH18).

No grupo das pectinases, 2 proteínas da família GH28 foram encontradas e com uma abundância baixa. Também foram identificadas proteínas das famílias GH

15 e GH31 classificadas como amilases, e uma proteína que possui o domínio que identifica uma GH30 no grupo de proteínas hipotéticas, mas sem mais informações detalhadas a respeito dessa proteína.

Enzimas com atividade auxiliar (AAs) que apareceram no secretoma do fungo foram classificadas e inseridas no grupo das oxidoredutases, e são representadas por 6 proteínas da família AA9, denominadas monooxigenase de polissacarídeo (em inglês, *Lytic polysaccharide monooxygenase* – LPMOs) e uma pertencente à família AA3, celobiose desidrogenase. Ambas apresentam valores de abundância notáveis no secretoma do fungo, 53 e 17, respectivamente.

O genoma de *P. chrysosporium* (v2.2) apresenta 16 cópias de AA9s. Essas enzimas cada vez ganham mais atenção nos estudos para formulação de coquetéis enzimáticos (OHM et al., 2014). É importante destacar que representam 5 % da abundância total das proteínas presentes no secretoma do fungo em avicel. O estudo desse grupo de enzimas oriundas de basidiomicetos pode ser importante, já que esse fungo apresenta eficiência na degradação de celulose. O genoma de *P. chrysosporium* (v2.1) apresentava pelo menos 13 sequências pertencentes à AA9, e seis desses genes são claramente expressos nas condições estudadas por Wymelenberg (2006), onde *P. chrysosporium* foi crescido em meio basal com avicel como fonte de carbono por 6 dias. Os resultados do presente trabalho colaboram para a conclusão que avicel induz a produção de LPMO's.

O último grupo de CAZymes presente no secretoma de *P. chrysosporium* inclui as carboidrato esterases (CE). São enzimas que auxiliam a atividade das glicosil hidrolases sobre os substratos por removerem grupos acetil e hidroxicinamil presentes na cadeia das hemiceluloses. Os resíduos de acetil derivados das cadeias de xilana são liberados por acetilxilana esterases pertencentes às famílias CE 1, 4, 5 e 16 (BIELY et al. 2011). Este grupo representou 5% da abundância total de proteínas do secretoma do fungo. Foram encontradas 3 famílias de carboidrato esterases, CE1, 15 e 16. A família CE1 foi a mais abundante e foram identificadas 2 acetil xilana esterases (ID JGI |126075| e |2983171|). A proteína |126075| foi a mais abundante do grupo.

1.3.1.2 Análise do secretoma de *T. versicolor* em celulose microcristalina

As informações sobre o secretoma de *T. versicolor* são bem mais escassas do que de *P. chrysosporium*. Na literatura foi encontrado apenas um trabalho sobre o secretoma detalhado deste fungo-e abordou sua ação sobre o substrato suco de tomate (CARABAJAL et al., 2013). Além disso, o foco desse estudo foram as enzimas oxidativas desse fungo, sistema bem mais explorado nos estudos do que seu complexo hidrolítico (ZHANG et al., 2017).

No presente trabalho foram identificadas 58 proteínas no secretoma de *T. versicolor* crescendo sobre avicel. As proteínas detectadas foram divididas em 10 grupos de acordo com a sua função biológica no metabolismo do fungo (Figura 1.8). Os grupos mais relevantes envolvem proteínas associadas com a degradação de celulose (10) juntamente com as proteínas hipotéticas descritas no genoma do fungo (9). Os outros grupos que completam o secretoma são 9 hemicelulases, 5 esterases, 3 oxidoredutases, 5 enzimas envolvidas na degradação da parede celular do fungo, 4 de pectinases e 4 amilases, além de 4 proteases e 5 enzimas com outras funções biológicas.

Figura 1.8 - Quantidade de proteínas detectadas no extrato de *T. versicolor* cultivado em celulose microcristalina.

Quando analisada a distribuição da abundância de proteínas dentro dos grupos funcionais encontrados no secretoma do fungo (Figura 1.9) podemos observar uma distribuição diferente do que a observada para a quantidade de proteínas encontradas.

Figura 1.9 - Distribuição da abundância relativa de cada grupo biológico de proteínas detectadas nos cultivos de *T. versicolor*. A abundância apresentada é derivada da abundância normalizada proveniente da análise por LC MS/MS dos extratos proteicos.

Fonte: Arquivo próprio

O grupo de enzimas que degradam a celulose foi novamente o mais abundante do secretoma, assim como visto para *P. chrysosporium*, representando cerca de 48 % do secretoma. O segundo grupo mais abundante foi das hemicelulases, com 27 %. Essa maior expressão de enzimas de degradação da celulose e hemicelulose obtidas permite inferir que o meio basal com sais e avicel como fonte de carbono foi extremamente eficaz na indução de enzimas hidrolíticas, sendo que esses dois grupos representam 75 % do secretoma, demonstrando a predominância de enzimas que participam da desconstrução da fração polissacarídica dos materiais.

Cerca de 10 % do secretoma é representado por esterases, enzimas importantes na degradação da fração hemicelulósica e responsável pela quebra das interações dessa fração com a lignina. O secretoma de *T. versicolor* apresentou uma maior abundância de proteases (cerca de 6%), do que a observada no secretoma de *P. chrysosporium* (não alcançou 1%).

O trabalho de Carabajal et al. (2013) que estudou o secretoma de *T. versicolor* utilizando como substrato suco de tomate apresentou um perfil de abundância diferente dos grupos. A abundância de hidrolases foi bem menor ao encontrado nesse trabalho, cerca de 21 %. Esta diferença vai de acordo com o substrato utilizado, pois o suco de tomate representa um meio de cultura rico em compostos fenólicos como flavonóides, taninos e tocoferóis (HERTOG ET AL., 1992). A produção e secreção de proteínas por fungos está intimamente relacionada à forma de cultivo no qual o microrganismo foi submetido (CRAGG et al., 2015). No secretoma de *T. versicolor* cultivado em suco de tomate também foi detectada a presença expressiva de enzimas oxidativas, como as peroxidases (peroxidase versátil – VP e manganês peroxidase – MnP) e fenoloxidasas (lacases), que representaram cerca de 37 % do secretoma. A fonte de carbono utilizada para a indução da expressão de proteínas, bem como a forma que essa fonte de carbono é apresentada para o microrganismo podem ter como consequência perfis proteicos bem distintos, tanto em relação à quantidade de determinadas proteínas secretadas quanto aos diferentes graus de diversidade do perfil proteico. Estas diferenças mostram a influência dos substratos na indução das proteínas e podem refletir a diversidade das estratégias de degradação da lignocelulose (METREVELI et al., 2017; MIKIASHVILI et al., 2005; RYTIOJA et al., 2014).

Dentro do secretoma de *T. versicolor* agindo em avicel, novamente, a maior parte das proteínas identificadas foi classificada como CAZymes, 40 proteínas (de um total de 58). Dessas, 32 foram classificadas no grupo das glicosil hidrolases (GH), 3 no grupo de enzimas que possuem atividades auxiliares (AA) e 5 proteínas com atividade de carboidrato esterases (CE). A abundância de cada grupo de CAZyme está apresentada na Figura 1.10.

Figura 1.10 – Abundância relativa de cada família CAZy detectada no extrato de *T. versicolor*. A abundância apresentada é derivada da abundância normalizada proveniente da análise por LC MS/MS dos extratos proteicos. Em parenteses, o número de proteínas encontradas para cada família.

Fonte: Arquivo próprio.

O grupo das glicosil hidrolases também foi o maior representante do secretoma de *T. versicolor*. As GHs mais abundantes são representadas por uma beta-glicosidase (GH3), 3 endoglucanases da família GH5_subfamília 5, 2 EG da família GH45, 1 celobiohidrolase II (GH6) e 3 celobiohidrolases I (GH7). Como também observado no secretoma de *P. chrysosporium*, a família GH7 foi a mais abundante no secretoma, representando 33 % das CAZy proteínas. Em conjunto com GH6, as celobiohidrolases representam 36 % das CAZy proteínas do extrato, e 34 % dentre todas as proteínas presentes no extrato.

Foram encontradas 6 famílias de glicosil hidrolases pertencentes ao grupo de enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose, entre elas, 1 mananase (GH5-subfamília 7), 3 endoxilanases da família GH10, duas enzimas com atividade em xiloglucanas (GH12), 1 arabinofuranosidase (GH51) e 1 alfa-manosidase da família GH92 e 1 galactan 1,3-beta-galactosidase da família GH43. As xilanases da família GH10 mostraram um alto valor de abundância no secretoma de *T. versicolor* em avicel, atingindo cerca de 20 % da abundância das CAZymes do extrato.

Outras glicosil hidrolases encontradas no secretoma do fungo foram classificadas no grupo das enzimas que degradam pectina, apresentando quatro famílias, diversificadas em proteínas com atividade de glucosylceramidase GH 30_subfamília 7), arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (GH53), beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (GH74) e alpha-L-rhamnosidase (GH78). Dentre esse grupo se destaca a abundância de 4 % da proteína da família GH53.

Entre as glicosil hidrolases observadas no secretoma, ainda se detectou as famílias GH18 e GH131 (com atividades envolvidas na degradação da parede celular de fungos) e GH27 e GH32 (envolvidas na degradação de amido). Somadas, estas enzimas representam 3 % da abundância total do secretoma.

Foram encontradas três CAZy proteínas no grupo de enzimas com atividades auxiliares, sendo distribuídas em três famílias, AA3, AA8 e AA9. O grupo mais abundante das AAs foi a família 8, sendo a proteína identificada como celobiose desidrogenase com a presença de domínio redutor de ferro na sua sequência. Cinco proteínas distribuídas em duas famílias de carboidrato esterases foram identificadas no secretoma de *T. versicolor*. Quatro acetil xilana esterases da família CE 1 e uma acilhidrolase da família CE16. As enzimas com atividade de acetil xilana esterases foram as mais numerosas e as mais abundantes.

1.4 CONCLUSÃO

Ambos fungos possuem potencial para produção de extratos ricos em CBHs, comprovando assim a eficiência de avicel como indutor dessas enzimas, sendo visto pela crescente intensidade das bandas correspondente as CBHs ao longo do cultivo e pela grande representação delas nos secretoma dos fungos. O extrato de *P. chrysosporium* apresentou maior atividade em papel de filtro do que o extrato de *T. versicolor*. Além disso, ambos apresentaram atividade de FPAse crescente ao longo do tempo de cultivo.

O perfil de expressão das cópias dos genes de celobiohidrolases detectadas por real-time pode ser confirmado na análise do secretoma dos fungos, onde a PhcryCel7D foi a isoenzima mais expressa e mais quantificada no extrato, assim como TraveCel7C, que foi a cópia mais secretada da enzima e a que foi possível detectar por real-time qPCR.

A produção de enzimas com atividade em carboidratos (CAZy proteínas) por basidiomicetos apresenta um papel central na decomposição de materiais lignocelulósicos. A importância dessas enzimas pode ser observada pelo seu percentual dentro do total de proteínas secretadas. Mais de 70% do total de proteínas secretadas por *P. chrysosporium* e *T. versicolor* foram identificadas como CAZy proteínas. Além disso, foi possível obter um extrato rico em CBH, representando 37 % do total de abundância proteica do extrato de *P. chrysosporium* e 34 % do extrato de *T. versicolor*.

1.5 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, 2005.
- ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; SZE, S. K. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. **Journal of Proteomics**. v.75, p. 1493–1504, 2012.
- ALFARO, M. et al. Comparative and transcriptional analysis of the predicted secretome in the lignocellulose-degrading basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. **Environmental Microbiology**. v. 18, n. 12, p. 4710–4726, 2016.
- BARREIRO, C., GARCÍA-ESTRADA, C., MARTÍN, J.F. Proteomics methodology applied to the analysis of filamentous fungi – new trends for an impressive diverse group of organisms. In: Prasain, J.K. (Ed.), **Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles**. InTech, Rijeka, Croatia, p. 127–160, 2011.
- BENDTSEN, J.D., JENSEN L. J, BLOM, N, VON HEJNE, G., BRUNAK., S. Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion **Protein Eng. Des. Sel.**, v. 17, n. 4, p.349-356, 2004.
- BIELY, P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. **Biotechnology Advances**. v.30, p. 1575-1588, 2012.
- BLASTp. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248–254, 1976.
- CARABAJAL, M. et al. The secretome of *Trametes versicolor* grown on tomato juice medium and purification of the secreted oxidoreductases including a versatile peroxidase. *Journal of Biotechnology*, v. 168, n. 1, p. 15–23, 2013.
- ERIKSSON, K.; JOHNSRUD, S. C.; FOREST, S. Mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulen* turn with increased cellulase and β -D-glucosidase production. **Enzyme Microb. Technol.** v. 5, p. 425–429, 1983.
- Expasy. Disponível em: https://web.expasy.org/compute_pi/.
- FLOUDAS, D.; BINDER, M., RILEY, R., BARRY, K., BLANCHETTE, R. A., HENRISSAT, B., MARTÍNEZ, A. T., OTILLAR, R., SPATAFORA, J. W., YADAV, J. S, et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**. v. 336, p.1715–1719, 2012.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.** v. 59, p. 257-268, 1987.

HENRISSAT, B. 1991. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J.** v. 280, p.309–316.

HERTOG, M.G.L., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2379–2383, 1992.

HORI, C. et al. Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 321, n. 1, p. 14–23, 2011.

KOLBE, J., KUBICEK, C. P. Quantification and identification of the main components of the *Trichoderma* cellulase complex with monoclonal antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 34, p. 26–30. 1990.

LEVIN, L., et al. Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. **Process Biochemistry**, v.42, p.995-1002, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MARTINEZ, D., LARRONDO, L. F., PUTNAM, N., GELPKE, M. D, HUANG, K., CHAPMAN, J., HELFENBEIN, K. G., RAMAIIYA, P., DETTER, J. C., LARIMER, F., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B., BERKA, R., CULLEN, D., ROKHSAR, D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nat. Biotechnol.** v. 22 p.695–700, 2004.

LORENZO, M. et al. Improving lacase production by employing differentes lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**. v. 82, p. 109-113, 2002.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.

METREVELI, E. et al. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune*. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 652–660, 2017.

MIKIASHVILI, N. et al. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 13, p. 955–959, 2005.

MUNOZ, I. G., UBHAYASEKERA, W., HENRIKSSON, H., SZABO, I., PETTERSSON, G., JOHANSSON, G., MOWBRAY, S. L., STAHLBERG, J. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. **J. Mol. Biol.** v. 314 p.1097–1111, 2001.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 1308–1448, 2015.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

RAVALASON, H. et al. Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* strain CIRM-BRFM41 grown on softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 719–733, 2008.

SUZUKI, H., IGARASHI, K., SAMEJIMA, M. Cellotriose and cellotetraose as inducers of the genes encoding cellobiohydrolases in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Envir. Microb.**, v. 76, n.18, p.6164–6170, 2010.

SUZUKI, H.; K. IGARASHI; SAMEJIMA, M. Quantitative transcriptional analysis of the genes encoding glycoside hydrolase family 7 cellulase isozymes in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 299, p.159–165, 2009.

UZCATEGUI, E. et al. The 1,4-b-D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 19, p. 271–286, 1991.

VALÁŠKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 119–124, 2006.

VANDEN WYMELENBERG et al., 2006, WYMELENBERG, A. V.; MINGES, P.; SABAT, G.; MARTINEZ, D.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; GRIGORIEV, I.; SHAPIRO, H.; PUTNAM, N.; BELINKY, P.; DOSORETZ, C.; GASKELL, J.; KERSTEN, P.; CULLEN, D. Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. **Fungal Genetics and Biology**, v.43, p: 343–356, 2006.

WYMELENBERG, A. V.; COVERT, S.; CULLEN, D. Identification of the gene encoding the major cellobiohydrolase of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3492–3494, 1993.

WYMELENBERG, A. VANDEN et al. Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3599–3610, 2010.

ZHANG, X.Y., ZI, L.H., GE, X.M., LI, Y.H., LIU, C.G., BAI, F.W. Development of *Trichoderma reesei* mutants by combined mutagenesis and induction of cellulase by low-cost corn starch hydrolysate. **Process Biochem.**, n. 5, p. 96–101, 2017.

CAPÍTULO 2:

Avaliação do potencial de extratos enzimáticos de basidiomicetos ricos em celobiohidrolases na sacarificação de materiais lignocelulósicos.

2.1 INTRODUÇÃO

Dentre os polissacarídeos da biomassa vegetal, a conversão de celulose em glicose tem sido o objetivo de um segmento industrial emergente que visa converter materiais lignocelulósicos em combustíveis e insumos químicos. A conversão enzimática da celulose tem sido considerada uma estratégia atraente devido à possibilidade de se alcançar rendimentos de sacarificação próximos aos teóricos. A conversão enzimática da celulose em açúcares redutores é um processo que requer ações cooperativas de três tipos de enzimas que atuam sinergicamente. Endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) atacam aleatoriamente cadeias de celulose, expondo as extremidades redutora e não-redutora das fibras de celulose. Então, as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras, liberando as unidades de celobiose que, por ação da enzima celobiose / β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21), são convertidas em glicose (LYND et al., 2002).

As celobiohidrolases (CBH), em particular, são consideradas enzimas-chaves no processo de hidrólise da celulose, pois corresponde ao único grupo capaz de hidrolisar celulose cristalina de forma eficiente. No CAZy, as CBHs estão classificadas nas famílias das glicosil hidrolases 6 e 7, de acordo com a extremidade da cadeia de celulose que hidrolisam, redutora (GH7) e não redutora (GH6). Em vários fungos celulolíticos, como o ascomiceto *Trichoderma reesei* (ILMÉN et al., 1997) e o basidiomiceto de podridão-branca *P. chrysosporium* (UZCATEGUI et al., 1991a), as principais proteínas produzidas sob condições indutoras de celulase são as CBH (PAYNE et al., 2015).

Fungos basidiomicetos degradadores de madeira apresentam a capacidade de produzir simultaneamente enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para degradar substratos lignocelulósicos. Os fungos de podridão branca são conhecidos por produzirem todos os grupos de enzimas de forma a prover sua adaptação ao meio rico em lignina (VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2006). Em especial são particularmente importantes porque degradam eficientemente todos os componentes da parede celular lignificada (NILSSON, 2009; RYTIOJA et al., 2014).

e *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* são frequentemente encontrados em madeira decídua morta e madeira de coníferas. Ambos os fungos podem degradar simultaneamente celulose, hemiceluloses e lignina (LUNDELL; MÄKELÄ; HILDÉN, 2010).

Após a descrição do genoma de muitas espécies fúngicas, tem aumentado a busca por novas enzimas capazes de melhorar a eficiência dos coquetéis enzimáticos atuais. Apesar da potencialidade das enzimas de basidiomicetos, são escassos os trabalhos com pesquisas relacionadas a utilização dessas enzimas na sacarificação da biomassa vegetal (FALKOSKI et al., 2012; RÄTTÖ; RITSCHKOFF; VIIKARI, 1997; RYTIOJA et al., 2015; VALADARES et al., 2016). Neste contexto, o presente trabalho visa produzir e aplicar extratos ricos CBHs dos basidiomicetos *P. chrysosporium* e *T. versicolor* na hidrólise de biomassa in vitro, visando a avaliação do potencial de sacarificação dessas enzimas. Ensaio de sacarificação utilizando um complexo comercial de celulase foram realizados em paralelo, a fim de estabelecer uma comparação entre os desempenhos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Cultivo de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* em celulose microcristalina (Avicel) para obtenção de extrato enzimático rico em CBH

Os ensaios para obtenção de extratos enriquecidos em CBH foram conduzidos em Erlenmeyers de 1L com 300 mL de meio Norkrans modificado (ERIKSSON; JOHNSRUD; FOREST, 1983) com 2% de avicel como fonte de carbono. O cultivo foi realizado a 27 °C para *T. versicolor* e 37 °C para *P. chrysosporium* em agitador orbital, 150 rpm por 12 dias. O micélio e o restante de avicel foram separados da fração líquida através da filtração utilizando uma malha sintética de 200 mesh.

Os extratos de proteínas obtidos de ambos cultivos foram concentrados em dispositivo de ultrafiltração (Amicon – Millipore) a 10°C utilizando membrana PES com corte nominal de 10kDa (Millipore). O extrato de proteínas concentrado retido pela membrana foi coletado e armazenado em Ultrafreezer a - 80°C, sendo posteriormente liofilizado. O extrato liofilizado foi utilizado para determinação das

atividades enzimáticas hidrolíticas e ensaios de sacarificação de biomassa lignocelulósica.

2.2.2 Determinação das atividades enzimáticas nos extratos fúngicos e em misturas comerciais

Os extratos enzimáticos liofilizados obtidos dos cultivos de *T. versicolor* e *P. chrysosporium* foram dissolvidos em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8, na concentração de 28 e 15 mg/mL, respectivamente, e empregados nos ensaios de determinação de atividade enzimática. As atividades enzimáticas também foram determinadas nos coquetéis enzimáticos comerciais Cellic® CTec 2 e Novozym® 188 (SIGMA - catálogo nº SAE0020 e C6105, respectivamente).

2.2.2.1 Atividade de celulases totais (FPase)

As atividades de FPase foram determinadas nos extratos enzimáticos concentrados como modo de medir a atividade hidrolítica dos extratos ao longo do período de cultivo dos fungos. A atividade de FPase foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987).

A reação enzimática foi conduzida com 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, uma tira de papel de Whatman N° 1 de 1 x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático. As misturas foram aquecidas em banho a 50°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3,0 mL de DNS, sendo a mistura posteriormente fervida por 5 minutos (MILLER, 1959). Posteriormente, foram adicionados 20 mL de água destilada a cada tubo, seguido de agitação. Os controles para cada amostra foram feitos adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram lidos a 540 nm e convertidos a glicose através de uma curva de calibração. Um gráfico foi feito relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2,0 mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulases totais FPU.mL⁻¹.

2.2.2.2 Atividade de Celobiohidrolases (Avicelase)

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada seguindo a técnica descrita por Wood & Bhat (1988) que consiste em conduzir a hidrólise de uma suspensão de celulose microcristalina (Avicel) com o extrato enzimático. A quantidade de açúcares redutores formada foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Um volume de 0,5 mL de extrato enzimático foi misturado com 0,5 mL de suspensão de Avicel 1,0% (Fluka Biochemika 11365), em tampão acetato de sódio pH 4,8. Essa reação foi incubada a 50°C durante os tempos de 30, 45, e 60 minutos, sendo interrompida com a adição de 1,5 mL de DNS. Uma amostra controle de reação para cada tempo foi feita com 0,5 mL de tampão misturado com 0,5 mL de suspensão de Avicel, para determinar a concentração de açúcares redutores existente na mistura contendo somente Avicel. Após a adição de DNS as amostras foram fervidas por xx min e centrifugadas por 5 minutos a 15000 g. As absorbâncias do sobrenadante foram lidas a 540 nm e um gráfico foi construído com os teores de açúcares redutores versus tempo de reação. O teor de açúcares redutores foi determinado contra curva de calibração de glicose.

2.2.2.3 Atividade de Endoglucanases (CMCase)

A atividade de endo-1,4- β -glucanase foi medida a partir da conversão de carboximetilcelulose (CMC) em oligossacarídeos com maior número de extremidades redutoras, seguindo a metodologia proposta por Ghose (1987), que emprega uma conversão fixa de 2% do substrato em 30 minutos de reação. A carboximetilcelulose empregada foi de média viscosidade e grau de substituição 0,7 (SIGMA C5013).

Na determinação da atividade, diluições seriadas foram preparadas a partir dos extratos enzimáticos, sendo que duas dessas diluições proporcionaram a formação de açúcares redutores acima e abaixo de 0,5 mg. A mistura reacional consistia em: 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose 2% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8, e 0,5 mL de extrato enzimático. A reação foi condicionada em banho a 50°C por 30 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida com a adição de 3,0 mL de DNS, seguindo-se de fervura da mistura

por 5 minutos. Os controles da reação consistiram em amostra onde o reagente de DNS foi adicionado antes do extrato enzimático. Foi adicionado então 20 mL de água destilada e a mistura agitada para obtenção de uma solução homogênea. A leitura da absorbância foi feita a 540 nm.

Os valores de absorbância foram convertidos em massa de açúcares redutores através da curva de calibração baseada em glicose e os dados obtidos usados para construir um gráfico relacionando as diluições da enzima com a quantidade de açúcar redutor formado. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que proporcionaria a formação de 0,5 mg de açúcares redutores. O valor de 0,185 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de CMCase em UI.mL.

$$CMCase = \frac{0,185}{\text{concentração de enzima para liberação de 0,5 mg de AR}} \text{ (UI.mL}^{-1}\text{)}$$

2.2.2.4 Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada seguindo a metodologia de Tan, Mayers e Saddler (1987). A atividade de β -glicosidases foi calculada de acordo com a cinética de conversão de p-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) em p-nitrofenolato (pNP)

A mistura reacional consistia em 0,8 mL de solução 0,1% pNPG em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8, 0,2 mL do extrato enzimático. As reações foram conduzidas a 50°C, em diferentes tempos (2, 5, 10, 15 e 20 min). Para a parada da reação era então adicionado um volume de 2,0 mL de solução de bicarbonato de sódio 10%. (p/v). O controle de reação foi preparado com o condicionamento apenas da pNPG, adicionando-se, no final de cada tempo a solução de bicarbonato e após isso o extrato enzimático. A absorbância foi medida a 410 nm. Um gráfico de absorbância a 410 nm versus tempo de reação foi construído para determinação da atividade enzimática. A concentração de pNP formado por minuto foi calculada dividindo-se o coeficiente angular das curvas na faixa linear pelo coeficiente de extinção molar do pNP ($\epsilon = 15366$).

2.2.2.5 Atividade de Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Bailey, Biely e Poutanen (1992). Um volume de 0,1 mL de extrato enzimático foi adicionado a, 0,9 mL de solução de xilana de birchwood 1,0% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5, sendo a mistura incubada a 50°C durante diferentes tempos para obtenção da cinética de reação. A reação foi finalizada pela adição de 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 minutos. O controle foi feito adicionando o DNS antes do extrato enzimático. A leitura da absorbância da mistura reacional foi realizada a 540 nm e os valores obtidos convertidos em concentração de xilose através da curva de calibração de xilose.

2.2.2.6 Atividade de β – xilosidase

A metodologia para determinação da atividade de β - xilosidase descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987) é similar ao modo de determinação mencionando para β –glicosidase (item 2.2.2.4), mudando apenas o substrato de ação enzimática, que passa a ser 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) (SIGMA).

2.2.3 Quantificação de proteínas totais

O teor de proteínas foi determinado pelo Método de Lowry (GHOSE, 1987). Foram preparados 4 reagentes para determinação de proteínas:

Reagente A: Solução 2 % Na_2CO_3 0,4 % de NaOH (p/v)

Reagente B1: Solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v)

Reagente B2: Solução de tartarato de sódio e potássio 2 % (p/v)

Reagente C: misturaram-se 1 mL do reagente B1, 1 mL do reagente B2 e 100 mL do reagente A, nessa ordem.

Reagente Fenol (1 N) foi preparado a partir da diluição (1:2) do reagente Folin Ciocalteou (SIGMA).

Primeiramente, foram misturados 1,0 mL de extrato enzimático a 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação das proteínas. A mistura foi mantida a 4°C por 60 minutos. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 15000 g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso

em 1 mL de Reagente A. Um volume de 0,5 mL dessa solução foi misturado à 5 mL do Reagente C. Depois de 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL do Reagente de Fenol, seguida de agitação vigorosa. Após 30 minutos no escuro, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 750 nm. Uma curva de calibração foi construída com Albumina de Soro Bovino.

2.2.4 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos empregando os extratos fúngicos

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em pequena escala na qual se utilizou 20 mg em base seca de material lignocelulósico como substrato. Três diferentes substratos foram empregados visando cobrir uma ampla faixa de composição química e tipos de pré-tratamento: **a)** bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico empregando sulfito alcalino (10 g de Na₂SO₃ e 5 g de NaOH por 100 g de bagaço de cana) (MENDES et al., 2011); **b)** medula de cana-de-açúcar preparada a partir de um híbrido de cana de açúcar com baixo teor de lignina (H89) (COSTA et al., 2013a); **c)** bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído (13 g H₂SO₄/100 g de bagaço de cana) (SANTOS et al., 2018). Os substratos foram moídos para passar em malha de 20 mesh e suspensos em um volume final de reação de 1,0 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,01 % de azida sódica, contendo os diferentes coquetéis enzimáticos. A hidrólise foi conduzida em tubos criogênicos fechados e dispostos em Erlenmeyers sob agitação de 120 rpm a 45 °C por 72 h.

Os extratos enzimáticos utilizados nesses ensaios foram:

- I. Extrato de *P. chrysosporium* (12 dias);
- II. Extrato de *P. chrysosporium* (12 dias) com suplementação de β -glicosidase (Novozym® 188);
- III. Extrato de *T. versicolor* (12 dias);
- IV. Extrato de *T. versicolor* (12 dias) com suplementação de β -glicosidase (Novozym® 188);
- V. Extrato comercial Cellic® CTec2 -
- VI. Extrato comercial Novozym® 188 – rico em β -glicosidases de *Aspergillus niger*.

A carga dos extratos enzimáticos utilizados em todos os ensaios foi fixada em 10 FPU/g de substrato e a carga suplementar de β -glicosidases (quando houve) foi fixada em 20 UI/g de substrato.

Alíquotas foram retiradas do meio reacional em 4, 8, 24, 48 e 72 h de sacarificação. Para isso, os tubos foram retirados do agitador, imersos em banho de gelo/água e centrifugados a 15.000 g por 5 min. Após a centrifugação, 20 μ L de sobrenadante foi retirado e posteriormente foi adicionado 20 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para a precipitação das proteínas. A mistura foi diluída e congelada. Antes da análise de glicose e xilose por HPLC as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 15.000 g por 5 min. A concentração de açúcares determinadas por HPLC foram utilizadas para cálculos de conversão de glucana a glicose e da xilana a xilose promovida pelos extratos enzimáticos.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização das atividades de enzimas hidrolíticas presentes nos extratos enzimáticos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor*

A caracterização nos níveis de atividade de celulases e xilanases presentes nos extratos enzimáticos dos basidiomicetos foram realizadas para uma melhor avaliação do efeito da composição de enzimas nos experimentos de hidrólise do bagaço de cana.

As atividades de FPAse e CMCase foram determinadas pela metodologia descrita por Ghose (1987), enquanto para os demais grupos de enzimas as determinações das atividades foram feitas a partir do estudo cinético da reação com os substratos específicos de cada caso. A caracterização dos extratos enzimáticos quanto à atividade sobre diferentes substratos está apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Teor de proteínas e atividade de celulases e hemicelulases presentes no extrato liofilizado do cultivo de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* em celulose microcristalina.

Extrato enzimático	teor de proteína (mg/g)	Atividade enzimática (UI) /g de extrato liofilizado					
		FPAse	CMCase	CBH	β -GLI	XIL	β -XILO
<i>P. chrysosporium</i>	92	33	2029	39	194	16609	281
<i>T. versicolor</i>	156	21	1843	4	3123	139487	1501

Fonte: Arquivo próprio.

2.3.2 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos empregando os extratos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor*

Para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática, uma quantidade de liofilizado dos extratos fúngicos foi ressuspensa e sua atividade em papel de filtro averiguada. Com esse dado, foi possível calcular a quantidade de extrato liofilizado para atingir a carga de 10 FPU/ g de substrato utilizada nos ensaios de hidrólise. Ensaios de hidrólise de referência, empregando os mesmos substratos, foram realizados com celulasas comerciais (Cellic® Ctec2 e Novozyme 188).

Foram utilizados três substratos para a avaliação da capacidade de sacarificação desses extratos: medula de cana-de-açúcar de um indivíduo híbrido (H89) que apresenta baixo teor de lignina (COSTA et al., 2013), bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (MENDES et al., 2011) e bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído (SANTOS et al., 2018). A Tabela 2.2 apresenta a composição química desses materiais.

Tabela 2.2 - Composição química dos substratos utilizados nos ensaios de hidrólise enzimática

Substrato lignocelulósico	Composição química (g/ 100 g bagaço)					
	Glucana	Xilana	Arabinosil	Acetil	Lignina	Extrativos
Medula do híbrido 89	50.4 ± 0.3	14.8 ± 0.1	3.5 ± 0.1	2.7 ± 0.6	12.9 ± 0.2	3.8 ± 0.1
Bagaço sulfito alcalino	54.7 ± 0.6	20.3 ± 0.1	*	*	14.7 ± 0.5	*
Bagaço ácido	51.9 ± 0.6	9.6 ± 0.1	0.6 ± 0.01	0.9 ± 0.4	30 ± 0.7	6.0 ± 0.3

Fonte: Arquivo próprio

A medula da cana de açúcar do híbrido 89 desde sua caracterização tem sido utilizada como referência na medida de atividades enzimáticas em materiais lignificados (in situ), além de servir como referência em estudos de digestibilidade de polissacarídeos (VÁRNAI et al., 2014). A medula da cana de açúcar é uma região rica em células parenquimáticas e pobre em presença de vasos vasculares e fibras, concedendo assim uma característica com baixa recalcitrância ao material (COSTA et al., 2013).

As características observadas em materiais que sofreram tratamentos sulfito alcalino são: alto teor de polissacarídeos e baixo teor de lignina. Durante o tratamento sulfito alcalino ocorre a degradação e solubilização parcial da lignina enquanto os polissacarídeos são relativamente preservados (MENDES et al., 2011)

A hidrólise dos materiais lignocelulósicos com ácido diluído confere ao material uma característica oposta àquela observada no bagaço tratado com sulfito alcalino. A ação do ácido sobre o material se dá pelo ataque à fração polissacarídica, através de reações de hidrólise principalmente das O resultado dessa ação gera um material com maior teor de lignina, e uma celulose residual com maior proporção de celulose cristalina, visto que frações amorfas da celulose podem ser hidrolisadas durante o pré-tratamento (SANTOS et al., 2018).

*2.3.2.1 Digestibilidade dos substratos quando utilizado extrato enzimático de *P. chrysosporium*.*

O extrato liofilizado de 12 dias de cultivo de *P. chrysosporium* foi utilizado para avaliação da sua capacidade de sacarificação de biomassa lignocelulósica. Foram feitos ensaios com e sem suplementação de β -glicosidases. A figura 2.1 mostra a conversão de glucana e xilana dos três substratos lignocelulósicos avaliados em função do tempo de reação. A carga de cada atividade enzimática existente no meio reacional foi calculada e decorreu da adição de uma carga de 10 FPU/g de substrato, sendo apresentada simultaneamente à Figura 2.1 para auxiliar na interpretação dos dados de eficiência de hidrólise (Tabela 2.3)

Figura 2.1.- Cinéticas de conversão de glucana (I, II, e III) e xilana (IV, V, VI), utilizando extratos enzimáticos de *P. chrysosporium* sem suplementação e com suplementação de β -glicosidases, extrato comercial Cellic® Ctec2 e extrato comercial Novozyme 188. Os gráficos I e IV; II e V; II e VI correspondem aos substratos medula de cana-de-açúcar do híbrido 89, bagaço de cana pré-tratado com 10 % de sulfito e 5 % de NaOH e bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído, respectivamente.

Fonte: Arquivo próprio

Tabela 2.3 - Mapeamento das atividades enzimáticas presentes no meio reacional de hidrólise enzimática empregando os extratos enzimáticos de *P. chrysosporium* e dos extratos comerciais Cellic® Ctec2 e Novozyme 188.

Extrato enzimático	Proteína (mg/mL)	FPase (UI/mL)	CMCase (UI/mL)	β -gli (UI/mL)	CBH (UI/mL)	Xil (UI/mL)	β -xilo (UI/mL)
<i>P. chrysosporium</i>	0.56	0.2	12.3	1.2	0.2	100.7	1.7
Cellic® Ctec2	0.21	0.2	5.3	9.6	0.4	20.1	0.1
Novozym® 188	0.03	nd	0.012	0.41	nd	1.05	0.003

nd = não detectada.

Fonte: Arquivo próprio.

Os ensaios de hidrólise com extrato enzimático de *P. chrysosporium* mostraram que o substrato que sofreu a maior conversão de glucana foi a medula do híbrido 89. Os valores observados para a hidrólise com o extrato puro atingiram, em 72 horas de reação, 60 % de conversão a glicose. Quando o extrato foi suplementado com β -glicosidases foi observado um aumento no valor de conversão das glucanas em todos os substratos. Foi avaliada a eficiência de conversão do extrato de β -glicosidases sozinho sobre os substratos como uma reação de referência. Na conversão da medula o extrato de β -glicosidases proporcionou uma conversão de 22 %, valor 10 vezes maior do que o observado nos outros dois substratos. A suplementação do extrato de *P. chrysosporium* com β -glicosidases acarretou um aumento de 19 % na conversão final de glucanas, atingindo patamares de 80 % de conversão a glicose. Se faz importante destacar que esse valor foi o observado quando utilizado o extrato comercial CTec 2. Além disso, pode ser visto que esses valores de conversão vão de acordo com o encontrado por Costa et al., (2013), que utilizou a combinação de dois extratos comerciais (10 FPU de Celluclast® 1.5L (Novozymes - Bagsværd, Dinamarca) e 20 UI/g de Novozym® 188) observando uma conversão de 86 % da glucana da medula desse mesmo indivíduo, H89.

A avaliação da proporção de cada atividade enzimática nos meios reacionais (Tabela 2.3) permite verificar que o extrato de *P. chrysosporium* apresenta metade da atividade de CBH apresentada por CTec2, além de cerca de 8 vezes menos β -glicosidase. Contudo, ao suplementar os extratos de *P. chrysosporium* com Novozyme mostrou um efeito aditivo na eficiência de conversão de glucanas, sugerindo que a CBH de *P. chrysosporium* apresenta uma alta atividade catalítica em substratos lignocelulósicos não pré-tratados como a medula de cana, mesmo em condições de baixa carga relativa de CBH.

As conversões de glucana nos substratos bagaço pré-tratado por sulfito alcalino e bagaço pré-tratado com ácido diluído alcançaram 30 % e 16%, respectivamente. A suplementação dos extratos com β -glicosidase elevou os patamares de conversão de glucana para 42% e 23%, respectivamente. Estes valores foram significativamente menores do que o observado durante a hidrólise com CTec2 que proporcionou conversões de glucana de 80 e 37 % para os mesmos substratos, respectivamente. Quando a matriz lignocelulósica do substrato foi mais complexa e sofreu maiores alterações físico-químicas, como os bagaços pré-

tratados, a conversão obtida pelos extratos com *P. chrysosporium* foram menores. Um dos fatores que podem ter influenciado essa diferença é a menor carga de CBH do extrato de *P. chrysosporium*. Além dessa redução de carga, foi observado também que a CBH de *P. chrysosporium* apresenta uma menor processividade em celulose cristalina que a CBH de *T. reesei* (KURAŠIN; VÄLJAMÄE, 2011; MOMENI et al., 2013).

De modo geral, o bagaço pré-tratado com ácido diluído, como já visto, foi o mais recalcitrante a ação de todos os extratos enzimáticos na conversão de glucana. Ainda não está completamente esclarecido quais características de substrato têm o maior impacto na taxa de hidrólise da celulose, contudo o alto teor de lignina do material (30 %) é um dos fatores que mais influenciam essa diminuição na hidrólise da celulose pelos extratos. Diversos trabalhos corroboram com essa hipótese, nos quais a lignina foi adicionada externamente, demonstraram que um teor mais elevado de lignina causava uma inibição mais severa na hidrólise enzimática da celulose (RAHIKAINEN et al., 2011; ZHANG et al., 2016). Um dos fatores que pode acarretar a diminuição da atividade celulolítica é a adsorção improdutiva dessas enzimas na lignina residual desse substrato. A absorção não produtiva das proteínas em lignina (em vez de celulose) conduzem à diminuição da atividade enzimática e reduz dramaticamente a conversão (SELIG et al., 2007). Vários mecanismos de ligação foram propostos em interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de ligação a carboidratos (GAO et al., 2014, SAMMOND et al., 2014, VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2013).

A conversão de xilana apresentou um padrão diferente do observado para a conversão da glucana. Todos os substratos apresentaram valores próximos de conversão quando utilizado o extrato de *P. chrysosporium* sem suplementação de Novozyme (22 % para medula do H89, 25 % no bagaço sulfito alcalino e 19 % no bagaço ácido). Com a suplementação esses valores aumentaram para 36, 47 e 38 % respectivamente. Na medula do H89 e no bagaço pré-tratado com ácido diluído, a conversão de xilana atingiu valores similares aos observados nas hidrólises com CTec2 (39 e 41 %). Já a conversão de xilana no bagaço pré-tratado com sulfito alcalino foi significativamente maior com CTEC 2 (85 %). Como observado, a suplementação com β -glicosidases aumentou os valores de conversão de xilana em todos os substratos. Isso pode ser devido à grande quantidade de atividade xilulolítica que o extrato apresenta (o dobro da atividade de β -glicosidase), sendo

que o extrato quando aplicado sozinho hidrolisa 10 % da xilana da medula do H89, 11 % no bagaço sulfito alcalino e 15 % no bagaço ácido. A sinergia da suplementação com β -glicosidases foi mais observada na hidrólise do bagaço sulfito alcalino, onde a diferença entre a conversão observada para o extrato comercial sozinho foi de 11 % e o quanto acrescentou quando usado como suplementação do extrato enzimático de *P. chrysosporium* (acrécimo de 22 % na conversão final de xilana).

2.3.2.2 Digestibilidade dos substratos quando utilizado extrato enzimático de *T. versicolor*

O extrato liofilizado de 12 dias de cultivo de *T. versicolor* foi utilizado para avaliação da sua capacidade de sacarificação de biomassa lignocelulósica. De forma similar ao empregado com extrato de *P. chrysosporium*, os ensaios de hidrólise enzimática com o extrato de *T. versicolor* também foram feitos com e sem a suplementação de β -glicosidases. A Figura 2.2 mostra a cinética observada na conversão de glucana e xilana desses materiais utilizando esses três extratos enzimáticos.

Analisando os resultados de hidrólise enzimática obtidos com a utilização do extrato de *T. versicolor* foi visto novamente que a medula do H89 mostrou os maiores valores de conversão de glucanas. O extrato do fungo, sem suplementação, converteu cerca de 65 % da glucana. A suplementação do extrato com β -glicosidases acarretou um ganho de 5 % na conversão desse açúcar, contudo não atingiu o observado para o extrato comercial ctec2 (80%).

A conversão da glucana presente no bagaço sulfito alcalino pela ação do extrato puro do fungo foi semelhante a observada com o extrato de *P. chrysosporium*, cerca de 30 %. Contudo, esse valor foi inferior ao observado quando o extrato de *P. chrysosporium* foi suplementado, que atingiu 40 % de conversão da glucana residual e bem inferior a observada pela CTec2 (80 %).

Figura 2.2.- Cinéticas de conversão de glucana (I, II, e III) e xilana (IV, V, VI), utilizando extratos enzimáticos de *T. versicolor* sem suplementação e com suplementação de β -glicosidases, extrato comercial Cellic® Ctec2 e extrato comercial Novozyme 188. Os gráficos I e IV; II e V; III e VI correspondem aos substratos medula de cana-de-açúcar do híbrido 89, bagaço de cana pré-tratado com 10 % de sulfito e 5 % de NaOH e bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído, respectivamente.

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela 2.4 - Mapeamento das atividades enzimáticas presentes no meio reacional de hidrólise enzimática proveniente dos extratos enzimáticos de *T. versicolor*, comerciais Cellic® ctec2 e Novozyme 188.

Extrato enzimático	Proteína (mg/mL)	FPase (UI/mL)	CMCase (UI/mL)	β -gli (UI/mL)	CBH (UI/mL)	Xil (UI/mL)	β -xilo (UI/mL)
<i>T. versicolor</i>	1.50	0.2	17.7	30	0.04	540	14
Cellic® Ctec2	0.21	0.2	5.3	9.6	0.4	20.1	0.1
Novozyme 188	0.03	*	0.012	0.41	**	1.05	0.003

nd = não detectada.

Fonte: Arquivo próprio.

Novamente foi visto que a matriz lignocelulósica do substrato complexa e com alterações físico-químicas levou a uma drástica diminuição na conversão de glucana por *T. versicolor*, sendo essa a mais baixa observada. Um dos fatores que explicam essa baixa conversão é que a carga de CBH do extrato de *T. versicolor* é 5 vezes mais baixa que a de *P. chrysosporium* e 10 vezes mais baixa que a de CTec2. Esse resultado demonstra o papel chave da celobiohidrolase na sacarificação (PAYNE et al., 2015). Um dos fatores que explicam essa baixa conversão é que a carga de CBH do extrato de *T. versicolor* é 5 vezes mais baixa que a de *P. chrysosporium* e 10 vezes mais baixa que a de CTec2. Esse resultado demonstra o papel chave da celobiohidrolase na sacarificação (PAYNE et al., 2015).

Os valores observados pelo extrato puro na conversão da glucana presente no bagaço pré-tratado com ácido diluído foram baixos (15%) e a suplementação não acarretou nenhum aumento desse valor, ao contrário do observado para *P. chrysosporium*. Pode ser observado, em todos os substratos, que a suplementação do extrato de *P. chrysosporium* apresenta uma maior representatividade do que a observada quando suplementado o extrato de *T. versicolor*. Dois resultados prévios suportam esses resultados, a primeira é a atividade de β -glicosidase apresentada pelo extrato de *T. versicolor*, que é 16 vezes superior que a determinada no extrato de *P. chrysosporium*, vista na tabela 2.1. Além disso, a análise das proteínas secretas por esses fungos (capítulo 1 desta tese) mostra que *P. chrysosporium* não secretou β -glicosidase (GH3) nas condições de produção do extrato utilizado nos experimentos de sacarificação deste trabalho. Todavia, foi encontrada a secreção dessa enzima por *T. versicolor*, que apresentou um valor considerável de abundância relativa no extrato.

A conversão de xilana obtida com o uso do extrato de *T. versicolor* puro foi igual para todos os substratos testados, cerca de 30 % em 72 h de reação. Esse resultado foi semelhante também quando o extrato foi suplementado, todos os valores sofreram um aumento de 20 % na conversão, atingindo a conversão de metade da xilana presente em cada substrato. Esses valores foram superiores ao obtidos com o extrato de *P. chrysosporium*. Contudo, o padrão de cinética conversão de conversão da xilana dos substratos foi semelhante para os dois extratos fúngicos.

A conversão da xilana presente na medula e no bagaço ácido com o extrato suplementado foram superiores a observada pela ação do extrato da ctec2 (38 % na medula e 41 % no bagaço pré-tratado com ácido diluído), enquanto o extrato suplementado teve uma conversão de 50 % nos dois substratos.

2.3.2.3 Comparação entre características dos materiais na conversão de glucana

A ultra-estrutura da parede vegetal mostra que as cadeias de glucana são incorporadas pela hemicelulose e pela lignina em uma matriz lignocelulósica, e a quantidade desses componentes nas amostras influencia a ação das enzimas celulolíticas nas cadeias de glucana. Ao correlacionarmos os resultados de conversão de glucose ao enriquecimento de glucana frente as outras frações dos materiais (lignina e xilana), pode ser observado uma tendência de aumento na conversão de celulose com enriquecimento do material em glucana. Esse resultado pode ser observado graficamente na Figura 2.3.

Figura 2. 3 – Conversão de glucana (em 72 h) em relação ao enriquecimento de glucana nos três substratos entres todos os ensaios de hidrólise enzimática. Os ensaios em medula estão próximos a valores de 1,8, o bagaço sulfito alcalino a 1,5 e Bagaço ácido em 1,3.

Fonte: Arquivo próprio.

As conversões, em geral, seguiram as características químicas de cada substrato, sendo a medula o substrato mais rico em glucana, seguido do bagaço sulfito alcalino e bagaço ácido. Contudo, um ponto notadamente saiu da tendência observada na conversão em relação ao teor dos outros componentes. O extrato comercial Cellic® CTec2 apresentou valores altos quando aplicado sobre o bagaço sulfito alcalino. Sabe-se que esse extrato é compatível com diferentes matérias-primas lignocelulósicas e processos de pré-tratamento (NOVOZYMES, 2010). Contudo, foi afetado o seu potencial quando aplicado sobre o bagaço pré-tratado com ácido diluído, que possui o maior teor de lignina, além de seus componentes residuais possuírem características mais recalcitrantes. Em suma, entende-se que a busca por enzimas com boas características para elaboração coquetéis que contemplem diversos tipos de resíduos de materiais pré-tratados com diferentes técnicas.

2.4 CONCLUSÕES

Devido à sua importante atividade celulolítica, basidiomicetos possuem um grande potencial de aplicação na hidrólise da biomassa. No entanto, as celulasas destes fungos filamentosos ainda não foram caracterizadas em profundidade. Com o auxílio de técnicas de eletroforese foi possível observar uma superexpressão na região entre 50 e 60 kDa nos extratos de cultivo desses fungos sobre celulose microcristalina (Avicel), onde estão indicadas a presença das CBHs desses fungos. Através da determinação de atividade hidrolítica em papel de filtro foi possível observar potencial de aplicação desses extratos em ensaios de hidrólise enzimática.

Neste trabalho foi realizada a aplicação de extratos enzimáticos ricos em CBH de dois fungos degradadores de lignocelulósicos, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* na hidrólise de materiais lignocelulósicos para obtenção de açúcares fermentescíveis. Foi observado um grande potencial de sacarificação de biomassa lignocelulósica quando utilizados esses extratos enzimáticos, com valores de conversão de açúcares semelhantes ao extrato comercial Cellic® CTec2. O extrato enzimático de *P. chrysosporium*, com suplementação de β -glicosidases, atingiu patamares de conversão de glucana da medula da cana-de-açúcar do híbrido vistos com o extrato comercial Cellic® CTec2.

2.5 REFERÊNCIAS

BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

COSTA, T. H. F. et al. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202–211, 2013.

ERIKSSON, K.; JOHNSRUD, S. C.; FOREST, S. Mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulen* turn with increased cellulase and β -D-glucosidase production. **Enzyme Microb. Technol.** v. 5, p. 425–429, 1983.

FALKOSKI, D. L. et al. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1586–1603, 2012.

GAO, D. et al. Lignin triggers irreversible cellulase loss during pretreated lignocellulosic biomass saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2014.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase activities. **International Union of Pure And Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

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

ILMÉN, M., SALOHEIMO A.; ONNELA, M. L.; PENTTILÄ, M. E. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl Environ Microbiol.** v. 63, p.1298–1306, 1997.

KURAŠIN, M.; VÄLJAMÄE, P. Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 169–177, 2011.

LUNDEL, T.K., MÄKELÄ, M.R., HILDÉN, K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. **Journal of Basic Microbiology.** v.50, p. 5–20, 2010.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p. 506, 2002.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOMENI, M. H. et al. Structural, biochemical, and computational characterization of the glycoside hydrolase family 7 cellobiohydrolase of the tree-killing fungus *heterobasidion irregulare*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 8, p. 5861–5872, 2013.

NILSSON, T. Biological wood degradation. In: Ek M, Gellerstedt G, Henriksson, G (eds) **Wood Chemistry and Biotechnology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009. p. 219-244.

NOVOZYMES.Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials Disponível em <http://www.scienceplease.com/files/products/overviews/cellicctec2.pdf>. Acesso em 27/06/2019.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

RAHIKAINEN, J. et al. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 12, p. 2823–2834, 2011.

RÄTTÖ, M.; RITSCHKOFF, A. C.; VIKARI, L. The effect of oxidative pretreatment on cellulose degradation by *Poria placenta* and *Trichoderma reesei* cellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, n. 1, p. 53–57, 1997.

RYTIOJA, J. et al. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614–649, 2014.

RYTIOJA, J. et al. Saccharification of lignocelluloses by carbohydrate active enzymes of the white rot fungus *dichomitus squalens*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2015.

SAMMOND, D. W. et al. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 30, p. 20960–20969, 2014.

SANTOS, V. T. DE O. et al. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 722–730, 2018.

SELIG, M. J. et al. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 6, p. 1333–1339, 2007.

SUTO, M. TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.9, p. 305–311, 2001.

TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLE, J.N. Purification and characterization of athermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Can. J Microbiol.**, v. 33, p. 689-692, 1987.

UZZATEGUI, E. et al. The 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 2–3, p. 271–285, 1991.

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. 1–12, 2016.

VALÁŠKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 119–124, 2006.

VÁRNAI, A. et al. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, p-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: Reduced amount of water counterbalances the need. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6 n.30, 2013.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities. In: WOOD, T. M.; KELLOGG, S. T. eds., **Methods in enzymology**. London: Academy Press, 1988

ZHANG, L. et al. The dual effects of lignin content on enzymatic hydrolysis using film composed of cellulose and lignin as a structure model. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 761–769, 2016.

CAPÍTULO 3:

Produção e purificação de uma celobiohidrolase I (GH7) de *P. chrysosporium* e avaliação do seu potencial na sacarificação da biomassa vegetal

3.1 INTRODUÇÃO

A celulose é o polímero mais abundante na Terra e é um recurso alternativo para produzir combustíveis e produtos químicos que atualmente são gerados a partir de insumos de origem fóssil. (DOS SANTOS et al., 2019; TACHIOKA et al., 2017). A hidrólise da celulose cristalina é um passo crucial na utilização da biomassa celulósica e é geralmente o gargalo no processo bioquímico. Na tentativa de maximizar a eficiência e reduzir custos, muitos estudos sobre celulasas individuais e coquetéis enzimáticos foram realizados. Uma compreensão mais profunda da sacarificação da biomassa celulósica poderia aumentar a eficiência do desenvolvimento de biocombustíveis (IGARASHI et al., 2011).

As celobiohidrolases que hidrolisam a celulose em celobiose (dímero de glicose) são consideradas membros-chave dos seus coquetéis enzimáticos, desempenhando um papel importante na hidrólise da celulose cristalina (RYTIOJA et al., 2014). No CAZy, as CBHs são divididas em duas famílias de glicosil hidrolase: GH7 (CBHI, Cel7) e GH6 (CBHII, Cel6). Esta duas famílias contém enzimas que hidrolisam a celulose a partir da extremidade redutora e não redutora, respectivamente (LOMBARD et al., 2014). Em vários fungos celulolíticos, como o ascomiceto *Trichoderma reesei* (*TrCel7A*) (ILME et al., 1997) e o basidiomiceto de podridão-branca *Phanerochaete chrysosporium* (*PcCel7D*) (UZCATEGUI et al., 1991a), as principais proteínas produzidas sob condições indutoras de celulase são as celobiohidrolases da família GH7.

Diversos estudos compararam características bioquímicas e estruturais dessas duas proteínas. Um estudo comparou a ação processiva das duas enzimas sobre celulose bacteriana (KURAŠIN; VÄLJAMÄE, 2011). Entre estas duas enzimas, *PcCel7D* mostrou uma maior probabilidade de endo-iniciação e uma taxa de desorção de enzima 3,6 vezes maior do que *TrCel7A*. Por outro lado, a processividade da *PcCel7D* foi menor do que a reportada para *TrCel7A*, com uma média de 50 eventos hidrolíticos por iniciação de cadeia para *PcCel7D* comparado com 60 para *TrCel7A* (KURAŠIN; VÄLJAMÄE, 2011).

A comparação estrutural entre Pcel7D e TrCel7A foi reportada por Muñoz et al., (2001) e Von Ossowski et al., (2003). Estes autores realçaram a diferença entre o túnel que abriga o sítio catalítico dessas enzimas, sendo o túnel de TrCel7A mais fechado do que Pcel7D, sendo que a Pcel7D apresenta uma deleção de 4 aminoácidos em relação a TrCel7A (VON OSSOWSKI et al., 2003).

Apesar do enorme potencial biotecnológico, o número de enzimas de basidiomicetos que degradam polissacarídeos avaliadas na sacarificação da biomassa vegetal ainda é pequeno em comparação com as enzimas correspondentes dos ascomicetos (RYTIOJA et al., 2015). Considerando que os dois grupos de CBHs apresentam diferenças estruturais e na cinética de hidrólise de celulose é interessante testar a eficiência das enzimas de *P. chrysosporium* em aplicações onde o TrCel7A já é atualmente aplicada, afim de verificar se as enzimas podem se diferenciar frente a hidrólise de materiais lignocelulósicos complexos gerados por diferentes processos de pré-tratamento, possuindo, portanto, diferentes características químicas e estruturais.

O presente trabalho envolveu a produção e purificação de uma celobiohidrolase de *P. chrysosporium* para aplicação em ensaios de sacarificação de biomassa lignocelulósica de cana de açúcar. A ação hidrolítica da enzima foi avaliada a partir do emprego de um coquetel enzimático contendo também endoglucanases, β -glicosidases e xilanases. Três substratos distintos foram avaliados e a eficiência de hidrólise de polissacarídeos foi comparada com a obtida com um coquetel enzimático preparado com CBHI *Trichoderma longibrachiatum*

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Produção, concentração e liofilização dos extratos de *P. chrysosporium* rico em CBH

A manutenção da cepa de *P. chrysosporium* RP-78 e o modo de obtenção dos esporos estão bem detalhados no capítulo 1 desta tese (item 1.2.2.1). Para obtenção de grandes quantidades de extrato enzimático foram feitos cultivos em Erlenmeyers de 1 L com 300 mL de meio Norkrans modificado, com 2 % de avicel como fonte de carbono, como já detalhado também nos dois primeiros capítulos

dessa tese. Os cultivos foram conduzidos a 37 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 12 dias. O micélio crescido após 12 dias de cultivo e o avicel remanescente foram separados da fração líquida por filtração em malha sintética de 200 mesh. O extrato bruto foi filtrado através de filtro de vidro sinterizado com poro nº 2 e subsequentemente através de outro filtro de nº4 a fim de remover sólidos em suspensão. As frações líquidas foram então concentradas em célula de ultrafiltração Amicon® (Millipore) com capacidade de 350 mL, com sistema de aplicação positiva de ar comprimido, com agitação, utilizando membrana de polietersulfona (PES- 76 mm) com corte nominal de 10 kDa (Millipore). Após a concentração do extrato foi feita a determinação do teor de proteína e medida da atividade de FPase dos extratos, ambos baseados na metodologia de Ghose (1987). 75 mL de extrato concentrado (53 x) foi então liofilizado para posterior experimento de purificação.

3.2.2 Purificação de celobiohidrolase do extrato liofilizado de *P. chrysosporium*

3.2.2.1 Precipitação com sulfato de amônio e ultrafiltração para remoção de sais

Sulfato de amônio foi empregado como agente precipitante, segundo metodologia descrita por IGARASHI *et al.* (1998). Para esta etapa de purificação, o extrato liofilizado foi dissolvido em 10 mL tampão fosfato de sódio (20 mM pH=7,4) na concentração de 90 mg/mL. Após isso, 140 mL de uma solução de (NH₄)₂SO₄ (80,7 g) foi adicionada sob agitação ao volume de 10 mL de extrato redissolvido e condicionada em banho de gelo por 10 min. A saturação final de (NH₄)₂SO₄ foi de 70 %. A suspensão obtida foi centrifugada por 30 min a 3000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 500 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH=7,4. A solução foi então submetida à ultrafiltração (Amicon® (Millipore)), utilizando membrana de polietersulfona (PES) com corte nominal de 10 kDa (Millipore) para a remoção de sais.

3.2.2.2 Clean-up da amostra por cromatografia de troca iônica em bancada

Uma coluna de 25 mL dotada de placa porosa na base foi carregada com gel de DEAE Sepharose® Fast Flow (resina carregada positivamente, trocadora de ânions) suspenso em etanol 20% até que o volume de gel ocupasse 6 mL da coluna. Com o auxílio de uma bomba peristáltica, primeiramente a coluna foi lavada com cerca de 100 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. Foi então aplicado 25 mL do extrato concentrado a um fluxo de 0,5 mL/min e coletada a primeira fração de 25 mL (*washout*). Após isso, foi feita a lavagem da coluna com 12 mL do tampão de equilíbrio contendo fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 (fração zero). Após isso, foi iniciada a eluição de proteínas adsorvidas com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 com concentrações crescentes de NaCl: 100, 200, 300, 400, 500, 800 e 1000 mM. Foi passado dois volumes de coluna (12 mL) com cada concentração de sal. Para avaliação da etapa de clean-up foi feita a análise das frações coletadas em gel SDS-PAGE e a determinação da atividade de celobiohidrolase em avicel.

Após a análise das proteínas de cada fração por SDS-PAGE foi realizado uma segunda limpeza do extrato na coluna. Para isso, foram unificadas as frações *washout* e zero, totalizando 32 mL de extrato e novamente passadas na coluna, do mesmo modo que a primeira limpeza. Novamente o padrão de cada fração foi avaliado por SDS-PAGE e determinação da atividade de CBH.

3.2.2.3 Purificação da proteína por cromatografia de troca iônica e gel filtração em sistema HPLC

Para a cromatografia de troca iônica foi utilizada uma coluna HiPrep DEAE FF (16x100 mm com partículas de cerca de 90 µm (*GE Healthcare*)) acoplada ao sistema ÄKTA™ Purifier (*GE Healthcare*), equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. A injeção consistiu de 1 mL da solução de enzima, previamente filtrada em membrana PES (*Sartorius Stedim*) 0,45 µm para remoção de particulados. A eluição da coluna foi feita com um gradiente linear de NaCl de 0 a 300 mM com fluxo de 1,5 mL/min. Frações de 1,5 mL foram coletadas automaticamente na saída do sistema de detecção do cromatógrafo. Uma alíquota de cada fração foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE 12 % para a confirmação da presença da proteína de interesse. As frações com a presença da

proteína de interesse foram reunidas e concentradas em Vivaspin 20 (*GE Healthcare*) com membrana de corte de 10kDa.

O extrato concentrado e filtrado (1 mL) proveniente do passo de troca iônica foi aplicado em uma coluna de filtração em gel *Superdex 75 10/300 GL* (*GE Healthcare*) e eluído com tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) pH 7,4, a um fluxo de 0,3 mL/min coletando-se frações de 0,3 mL. As frações coletadas foram novamente analisadas por eletroforese em SDS-PAGE 12%.

3.2.2.4 Análise de perfil proteico das frações por eletroforese SDS-PAGE, dosagem da concentração de proteína e atividade de celobiohidrolase

As frações obtidas nas etapas de purificação por cromatografia foram avaliadas por eletroforese SDS PAGE realizada a 140 V em gel com 12% de poliacrilamida. O tampão de preparação de amostra utilizado foi “Laemmli sample buffer” (BioRad) composto de 62,5 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 25% de glicerol, 0,01% de azul de Bromofenol (pH 6,8), adicionado de 5% de 2-mercaptoetanol. O padrão de massa molar de 10 – 250 kDa (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, Bio – Rad) foi utilizado como referência para comparação das massas molares das bandas proteicas reveladas com solução de Coomassie blue. O teor de proteínas nas amostras analisadas foi determinado pelo Método de Lowry (GHOSE, 1987).

A atividade de exo-1,4- β -glucanase foi determinada seguindo a técnica descrita por Wood & Bhat (1988) que consiste em conduzir a hidrólise de uma suspensão de celulose microcristalina (Avicel) com o extrato enzimático. A quantidade de açúcares redutores formada foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959). Um volume de 0,5 mL de extrato enzimático foi misturado com 0,5 mL de suspensão de Avicel 1,0% (Fluka Biochemika 11365), em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8. Essa reação foi incubada a 50°C durante os tempos de 30, 45, e 60 minutos, sendo interrompida com a adição de 1,5 mL de DNS. Uma amostra controle de reação para cada tempo foi feita com 0,5 mL de tampão misturado com 0,5 mL de suspensão de Avicel, para determinar a concentração de açúcares redutores existente na mistura contendo somente Avicel. Após a adição de DNS as amostras foram fervidas por 5 min e centrifugadas por 5 minutos a 15000

g. As absorvâncias do sobrenadante foram lidas a 540 nm e um gráfico foi construído com os teores de açúcares redutores versus tempo de reação. O teor de açúcares redutores foi determinado contra curva de calibração de glicose.

3.2.3 Ensaios de hidrólise enzimática de substratos à base de biomassa de cana de açúcar

Foram preparados coquetéis enzimáticos com enzimas puras. A composição do coquetel de celulasas (celobiohidrolases e endoglucanases) foi feita em uma proporção de 80:20 de CBH:EG. A fim de estabelecer uma comparação entre os desempenhos, um coquetel foi preparado com a enzima purificada de *P. chrysosporium* neste trabalho e outro coquetel foi preparado com celobiohidrolase comercial de *Trichoderma longibrachiatum* (Megazyme - E-CBHI I - lote nº 40203a). A endoglucanase utilizada foi de *Talaromyces emersonii* (Megazyme - E-CELTE lote nº 30602). A carga de proteína essa mistura foi de 5 mg/ g de substrato base seca. A mistura foi suplementada com β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Megazyme - E-BGLUC – lote nº 150102) - com carga de 10 Ui/g base seca. Para completar o coquetel, foi adicionado uma carga de 0,25 mg/g de endoxilanase de *Thermotoga marítima* (Megazyme - E-XYLATM- lote nº 91101b) e β -xilosidase de *Selenomonas ruminantium* (Megazyme - E-BXSR-1KU – lote nº 100301c). em uma dosagem de 10 UI/g de substrato seco.

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em pequena escala na qual se utilizou 20 mg em base seca de material lignocelulósico como substrato. Quatro diferentes substratos foram empregados visando cobrir uma ampla faixa de composição química e tipos de pré-tratamento: **a)** bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico empregando sulfito alcalino (10 g de Na₂SO₃ e 5 g de NaOH por 100 g de bagaço de cana) (MENDES et al., 2011); **b)** medula de cana-de-açúcar preparada a partir de um híbrido de cana de açúcar com baixo teor de lignina (H89) (COSTA et al., 2013a); **c)** bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído (13 g H₂SO₄/100 g de bagaço de cana) (SANTOS et al., 2018). **d)** celulose microcristalina (Avicel – Fluka Biochemika 11365). Os substratos foram moídos para passar em malha de 20 mesh e suspensos em um volume final de reação de 1,0 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 e 0,01 % de azida sódica, contendo os diferentes coquetéis enzimáticos.

A hidrólise foi conduzida em tubos criogênicos fechados e dispostos em Erlenmeyers sob agitação de 120 rpm a 45 °C por 72 h. Alíquotas foram retiradas em 4, 8, 24, 48 e 72 h de sacarificação. Para isso, os tubos foram retirados do agitador, imersos em banho de gelo/água e centrifugados a 3400 g a 4°C por 15 min. Após a centrifugação, 20 µL de sobrenadante foi retirado e posteriormente foi adicionado 20 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para a precipitação das proteínas. A mistura foi diluída e feita a posterior análise de glicose e xilose por HPLC. A concentração de açúcares obtidas foi então utilizada para cálculos de conversão de glucana a glicose e da xilana a xilose promovida pelos extratos enzimáticos.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Produção e purificação de celobiohidrolase de *P. chrysosporium*

A celobiohidrolase produzida em maior quantidade por *P. chrysosporium* cultivado em Avicel, PcCel7D (proteína mais abundante no secretoma descrito no capítulo 1 da tese) foi purificada para a realização posterior de ensaios de sacarificação de biomassa de cana de açúcar. Diversos trabalhos já realizaram a purificação dessa enzima (IGARASHI; SAMEJIMA; ERIKSSON, 1998; SZABÓ; JOHANSSON; PETTERSSON, 1996; UZCATEGUI; EK; PETTERSSON, 1991). Entretanto, o foco dos trabalhos anteriores a realização de estudos bioquímicos de caracterização da enzima purificada. No presente trabalho, a etapa de purificação da CBH de *P. chrysosporium* visou gerar enzima suficiente para a realização de ensaios de sacarificação de substratos com características diferentes preparados a partir da biomassa lignocelulósica de cana de açúcar.

O extrato enzimático de *P. chrysosporium* apresenta alto teor de compostos oriundos do metabolismo do fungo que, de certo modo, dificultam a clarificação do extrato enzimático. Além disso, esses compostos podem ser prejudiciais para a coluna cromatográfica devido a sua interação irreversível com a matriz. Como modo de clarificar e limpar esse extrato, foram aplicadas etapas onde a cromatografia foi feita em colunas montadas em bancada com empacotamento de gel DEAE-Sepharose. O extrato liofilizado do fungo foi redissolvido em tampão e então precipitado pela adição de sulfato de amônio como uma primeira etapa de

purificação. O precipitado foi então redissolvido e ultrafiltrado contra membrana de 10 kDa. O concentrado proteico foi aplicado na coluna de bancada com um fluxo de 0,5 mL/min. A eluição das proteínas adsorvidas foi feita com um gradiente de zero a 1 M de NaCl. O resultado da atividade de CBH e perfil de proteína de cada fração obtida está apresentado na figura 3.1.

Figura 3.1. Atividade de celobiohidrolase e perfil de proteína em eletroforese SDS-PAGE (12 %) das frações após a primeira etapa de cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose) de bancada ao longo do perfil de eluição com NaCl. O volume de extrato no gel foi de 10 μ L (zero a 200 mM) e de 20 μ L (300 mM a 1M). O volume das frações foi de 25 mL “washout”, 12 mL “zero” e 12 mL na demais frações.

Fonte: Arquivo próprio.

A análise por eletroforese mostrou um grupo diverso de proteínas no extrato de *P. chrysosporium*, sendo que a banda intensa entre 50 e 75 kDa pode ser atribuída a CBHI (UZCATEGUI et al., 1991). A análise das diversas frações da eletroforese após a primeira injeção na coluna de troca iônica demonstrou que a proteína de interesse apresentou baixa interação com a coluna, sendo detectada predominantemente na fração de injeção na coluna (washout) e na fração de lavagem da coluna com tampão (fração zero). Nas frações de eluição com 100 e 200 mM de NaCl pode ser observada a banda correspondente a CBH, porém com menor intensidade. Na fração eluída com 200 mM aparece uma banda em torno de

40 kDa muito mais intensa do que a própria CBH de interesse. Nas demais frações não há quantidade significativa da CBH de interesse. A atividade de CBH recuperada em cada fração diminuiu proporcionalmente com a quantidade de proteína detectada na eletroforese.

Embora a CBH de interesse não tenha mostrado interação com a coluna, várias outras proteínas foram removidas nesse primeiro passo de cromatografia, visto que as frações eluídas com NaCl foram descartadas e o procedimento de purificação foi continuado somente com as duas primeiras frações (*wash out* e zero). Estas duas frações foram misturadas e novamente injetadas na coluna de bancada, sendo que os resultados das frações eluídas estão mostrados na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Atividade de celobiohidrolase e perfil de proteína em eletroforese SDS PAGE (12 %) das frações após a segunda etapa de cromatografia iônica (DEAE-Sepharose) de bancada ao longo do perfil de eluição com NaCl 1M.

Fonte: Arquivo próprio.

O perfil de proteína visto após a segunda injeção na coluna de troca iônica mostra bandas proteicas até 300 mM de sal, não aparecendo mais nas seguintes concentrações. Novamente a atividade de CBH foi maior nas duas primeiras frações (*washout* e zero). Foi selecionada a fração zero para a seguinte etapa de purificação, pois foi a fração que apresentou maior atividade de CBH por mL. O volume dessa fração foi concentrado em dispositivo de ultrafiltração Amicon com membrana de corte de 10 kDa até 1,1 mL e injetado em uma coluna de troca iônica acoplada a um sistema de HPLC. O perfil de separação dessa fração pode ser visto na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Cromatograma da fração zero na coluna de troca iônica (HiPrep DEAE FF) acoplada ao sistema ÄKTA™ ao longo da eluição com NaCl 1M. Indicado no Cromatograma o número da amostra selecionada para análise em SDS-PAGE. Condições: fluxo 1,5 mL/min, frações de 1,5 mL.

Fonte: Arquivo próprio.

No cromatograma da Figura 3.3 podem ser observados três picos detectados em 280 nm. Inicialmente sai um maior pico com todas as proteínas que não interagiram com a coluna, que saem com nenhuma adição de sal. Em torno da concentração de 5 % de NaCl 1M (50 mM - a partir do volume 40 até o 50 mL) aparece outro pico no comprimento de onda de 280 nm. Ambos picos foram avaliados em SDS-PAGE contudo não mostraram sinal da banda da CBH de interesse (dado não mostrado).

O terceiro pico do cromatograma inicia na faixa de 12 % de NaCl 1 M (120 mM), a partir do volume 70 até 110 mL. Neste pico foram realizadas análise das frações 1 ao 9 indicadas na Figura 3.3, sendo que cada amostra coletada nessa

etapa foi de 1,5 mL. O perfil de proteínas do terceiro pico pode ser visto na eletroforese SDS-PAGE apresentado na Figura 3.4.

Figura 3.4 – Análise de proteínas em eletroforese SDS-PAGE (12 %) em 9 alíquotas do terceiro pico encontrado na cromatografia de troca iônica em coluna HiPrep DEAE FF.

Fonte: Arquivo próprio.

A partir desse passo pode ser observado um extrato com grande grau de purificação, onde são vistas bandas com mais fácil distinção. A proteína Cel7D apresenta uma massa molar calculada de 58 kDa, contudo possui diversos pontos de glicosilação que aumentam seu tamanho, sendo possível inferir que a banda mais intensa entre 75 e 50 kDa é a proteína de interesse. UZCATEGUI et al. (1991) determinaram uma proteína com massa molar 60 kDa após purificação. O gel da eletroforese mostra que desde o início do pico a banda correspondente a CBH pode ser observada, além de uma outra proteína de cerca de 100 kDa. Ao longo do pico a intensidade de CBH aumenta, sendo que a outra proteína fica menos intensa. Devido a esse perfil, as amostras a partir da fração 3 até a 9, e todas alíquotas internas a esse intervalo foram unificadas e concentradas para injeção em uma coluna de exclusão por tamanho, visando separar a CBH de interesse da proteína de 100 kDa também detectada nas frações. O resultado dessa injeção pode ser visto no cromatograma apresentado na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Cromatograma após injeção na coluna Superdex 75 10/300 GL na etapa de cromatografia de exclusão molecular acoplada ao sistema ÄKTA™. Fluxo de 0,3 mL/min. Frações de 0,3 mL.

Fonte: Arquivo próprio.

Na etapa de exclusão por tamanho foi possível observar 3 picos que saíram próximos, iniciando em 8 mL e terminando em 12 mL. A coleta nessa análise foi de 0,3 mL a modo de obter uma boa separação dos picos através de pequenas coletas. O perfil de proteína desses picos pode ser visto na Figura 3.6, que apresenta o gel da eletroforese em SDS-PAGE dessas amostras.

Figura 3.6 – Análise de proteínas na eletroforese SDS-PAGE em nas alíquotas picos encontrados na cromatografia de exclusão molecular. Coluna *Superdex 75 10/300 GL*. Cada lane representa o volume da alíquota no cromatograma.

Fonte: Arquivo próprio

O gel de proteína mostra que a etapa de exclusão molecular foi bem-sucedida na intenção de separar a proteína de maior tamanho (100 kDa) da proteína de interesse, obtendo assim quatro alíquotas onde a celobiohidrolase de interesse está praticamente livre da proteína de 100 kDa. Essas alíquotas foram reunidas e utilizadas como fonte de CBH purificada de *P. chrysosporium* para a composição de misturas enzimáticas aplicadas em ensaios de sacarificação.

3.3.2 Hidrólise enzimática dos substratos lignocelulósicos com CBH de *P. chrysosporium* combinada em coquetéis enzimáticos com outras enzimas puras de origem comercial

Ensaio de sacarificação utilizando misturas enzimáticas de celulasas e xilanase foram realizados em paralelo, a fim de estabelecer uma comparação entre os desempenhos da celobiohidrolases de *P. chrysosporium* e *T. longibrachiatum* em diferentes substratos. Ambos extratos enzimáticos de CBH foram avaliados simultaneamente em eletroforese SDS-PAGE para comparação da pureza do extrato utilizado em cada caso (Figura 3.7). Foram feitas duas cargas de proteína de cada extrato para uma melhor definição.

Figura 3.7 – Análise de proteínas por eletroforese SDS-PAGE do extrato purificado de *P. chrysosporium* e do extrato comercial de CBH I de *T. longibrachiatum*, com diferentes cargas de proteína.

Fonte: Arquivo próprio

Foi observado que ambos extratos possuem grande pureza de CBH I. Relaciona-se a pequena banda abaixo da mais intensa nos extratos de *T. longibrachiatum* a uma porção da enzima que perdeu o domínio de ligação (CBM) ; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2013).

Os resultados da hidrólise de glucana dos materiais lignocelulósicos quando aplicados os diferentes extratos está demonstrado na figura 3.8.

Figura 3.8 – Cinética de conversão de glucana presente na medula de cana-de-açúcar do híbrido 89 (I), bagaço de cana pré-tratado com 10 % de sulfito e 5 % de NaOH (II), bagaço pré-tratado com ácido diluído (III) e celulose microcristalina (IV) pelos extratos compostos pelas CBHs de *P. chrysosporium* (linhas vermelhas) e *T. longibrachiatum* (linhas pretas).

Fonte: Arquivo próprio.

A medula da cana-de-açúcar do híbrido H89 por ser um substrato pouco recalcitrante devido ao seu baixo teor de lignina, além de apresentar menor área ocupada por vasos vasculares e mais células parenquimáticas (COSTA et al., 2013b) apresentou maiores valores de conversão de glucanas. O padrão de hidrólise causado por ambas misturas enzimáticas foi semelhante, apresentando uma conversão em 72 h de reação de 53 % com *T. longibrachiatum* e 59 % com *P.*

chrysosporium. Esse valor foi inferior ao observado por Várnai et al., (2014), que também hidrolisou a medula do H89 com uma mistura de enzimas puras, atingindo 77 % de conversão de glucana. Contudo, a proporção e conteúdo de enzimas utilizada diferiu da aplicada nesse trabalho, primeiro pela utilização de CBH II e duas endoglucanases de *T. reesei*, o que pode explicar a diferença na conversão final.

Os outros substratos testados apresentaram um grande perfil recalcitrante frente a aplicação das misturas enzimáticas, atingindo valores de cerca de 20 % de conversão de glucana. A mistura que continha a CBH de *P. chrysosporium* apresentou uma conversão semelhante à obtida com *T. longibrachiatum* no bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (25 % em 72h). Contudo, quando aplicada sobre bagaço pré-tratado com ácido e celulose microcristalina, a CBH de *P. chrysosporium* apresentou uma conversão menor de glucana ao longo da reação, atingindo 12 % em ambos substratos, enquanto a CBH de *T. longibrachiatum* atingiu 18 % em 72 h de reação.

Um dos fatores que pode explicar a baixa conversão da glucana residual presente no bagaço ácido é a grande teor de lignina (30%) (SANTOS et al., 2018). Sabe-se que a lignina modificada pode impedir a atividade das celulasas ligando-se a elas, diminuindo sua atividade catalítica, impedindo a hidrólise da lignocelulose por adsorção não produtiva das enzimas via CBMs (RAHIKAINEN et al., 2011; SELIG et al., 2007; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2013).

Outro fator é que o bagaço pré-tratado com ácido apresenta um alto teor de celulose cristalina (SANTOS et al., 2018), o que pode ser comparado quando observado a hidrólise de celulose microcristalina pura, ambos apresentando valores semelhantes para ambas misturas enzimáticas. Já foi observado que diferenças estruturais entre as CBHs de *T. reesei* e *P. chrysosporium* acarretam diferentes características químicas a atividade catalítica de cada proteína (VON OSSOWSKI et al., 2003). Os resultados obtidos nesse ensaio demonstram que a diferença de processividade das duas enzimas observada por Kurašin e Våljamäe (2011), sendo *P. chrysosporium* menos processiva que *T. reesei*, reflete em uma conversão menor de celuloses com alta cristalinidade.

Foi também avaliada a conversão de xilana dos materiais lignocelulósicos testados. As cinéticas de conversão obtidas pelas misturas estão apresentadas na figura 3.9. Ambos extratos apresentaram perfis semelhantes em todos os substratos, resultado esse que reforça a influência das distintas CBHs na conversão da glucana observada pelas misturas.

Figura 3.9 – Cinética de conversão de xilana presente na medula de cana-de-açúcar do híbrido 89 (I), bagaço de cana pré-tratado com 10 % de sulfito e 5 % de NaOH (II), bagaço pré-tratado com ácido diluído (III) e celulose microcristalina (IV) pelos extratos compostos pelas CBHs de *P. chrysosporium* (linhas vermelhas) e *T. longibrachiatum* (linhas pretas).

Fonte: Arquivo próprio.

3.4 CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho foi possível concluir que as etapas de purificação aplicadas foram bem-sucedidas na obtenção de um extrato com grande pureza de celobiohidrolase de *P. chrysosporium*. São necessários alguns experimentos de sequenciamento para confirmação que a celobiohidrolase purificada representa a proteína PcCel7D, embora a sua grande secreção determinada pelo secretoma estudado desse extrato fúngico seja um resultado que corrobora com o resultado apresentado neste capítulo.

Foi possível observar que a mistura enzimática que continha a CBH purificada de *P. chrysosporium* apresentou capacidade de sacarificação semelhante à obtida quando utilizada a CBH comercial de *T. longibrachiatum* quando aplicadas sobre medula de cana-de-açúcar do híbrido 89 e bagaço de cana pré-tratado com carga alta de sulfito alcalino (10 % de sulfito e 5 % de NaOH). Contudo esses resultados não foram observados quando a mistura foi usada na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído e sobre celulose microcristalina.

Apesar de diversos trabalhos de pesquisa, não é possível afirmar quais características de substrato têm o maior impacto na taxa de hidrólise, visto que dois substratos com algumas diferenças de composição, como o bagaço pré-tratado com ácido diluído e celulose microcristalina, apresentaram valores semelhantes de conversão quando aplicadas ambas misturas enzimáticas.

3.5 REFERÊNCIAS

COSTA, T. H. F. et al. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202–211, nov. 2013.

DOS SANTOS, A. C. et al. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 518–531, 2019.

IGARASHI, K. et al. Traffic Jams Reduce Hydrolytic Efficiency of Cellulase on Cellulose Surface. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1279–1282, 2011.

IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; ERIKSSON, K. E. L. Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 1, p. 101–106, 1998.

ILME, M. et al. Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1298–1306, 1997.

KURAŠIN, M.; VÄLJAMÄE, P. Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 169–177, 2011.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.

MUÑOZ, I. G. et al. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. **Journal of molecular biology**, v. 314, p. 1097–1111, 2001.

RAHIKAINEN, J. et al. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 12, p. 2823–2834, 2011.

RYTIOJA, J. et al. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614–649, 2014.

RYTIOJA, J. et al. Saccharification of lignocelluloses by carbohydrate active enzymes of the white rot fungus *dichomitus squalens*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2015.

SANTOS, V. T. DE O. et al. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 722–730, 2018.

SELIG, M. J. et al. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 6, p. 1333–1339, 2007.

SZABÓ, I. J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. Optimized cellulase production by *Phanerochaete chrysosporium*: Control of catabolite repression by fed-batch cultivation. **Journal of Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 221–230, 1996.

TACHIOKA, M. et al. Crystal structure of a family 6 cellobiohydrolase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Acta Crystallographica Section: F Structural Biology Communications**, v. 73, n. 7, p. 398–403, 2017.

UZCATEGUI, E. et al. The 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 2–3, p. 271–285, 1991.

UZCATEGUI, E.; EK, B.; PETTERSSON, G. The 1,4- β -D-glucan glucanohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. Re-assessment of their significance in cellulose degradation mechanisms. **Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 143–159, 1991.

VÁRNAI, A. et al. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, p-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI*, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited : Reduced amount of water counterbalances the need. **Siika-aho2**, v. 6, n. 30, 2013.

VON OSSOWSKI, I. et al. Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. **Journal of Molecular Biology**, v. 333, n. 4, p. 817–829, 2003.

CAPÍTULO 4:

Clonagem e expressão heteróloga de celobiohidrolases de *Phanerochaete chrysosporium*

4.1 INTRODUÇÃO

Na busca por enzimas mais eficientes para sacarificação é importante o estudo de técnicas para detecção, identificação e aumento na produção da enzima-alvo. Nas últimas décadas, geneticistas aprenderam como manipular o DNA para identificar e mudar o local dos genes em uma variedade de organismos diferentes do original. O maior uso para a maioria desses organismos recombinantes é a produção de proteínas, que em sua maioria apresentam grande valor comercial. Diante disso, muitos estudos têm focado em encontrar meios de produzir proteínas eficientemente em uma forma funcional (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). A expressão heteróloga é uma importante ferramenta para isolamento de novos genes e caracterização de proteínas (WANG; LU, 2016)

Fungos filamentosos são hospedeiros atrativos para a expressão de proteínas devido à sua capacidade natural para secretar grandes quantidades de proteínas para o meio (PUNT et al., 2002). Além disso, os fungos filamentosos são especialmente visados na expressão de proteínas provenientes de organismos eucarióticos, pois são capazes de realizar corretamente modificações pós-traducionais como glicosilação e dessulfonação ao contrário do que geralmente é observado na expressão em bactérias (NEVALAINEN et al., 2005, PUNT et al., 2002, SHARMA et al., 2009).

A busca por enzimas com melhor eficiência para a hidrólise enzimática da biomassa aponta como ótimas candidatas as enzimas secretadas por fungos degradadores de materiais lignocelulósicos. Fungos de decomposição branca são os mais eficientes degradadores da biomassa vegetal lignificada, o que permite supor que tais organismos apresentem complexos celulolíticos mais adaptados à degradação de materiais lignocelulósicos de elevada recalcitrância. Esses fungos têm o arsenal mais extenso de “enzimas ativas em carboidratos” putativas entre os basidiomicetos, permitindo que eles colonizem uma ampla variedade de plantas lignificadas. (FLOUDAS et al., 2012). Entre os fungos de degradação branca, a

espécie *Phanerochaete chrysosporium* é a mais amplamente caracterizada, sendo o primeiro basidiomiceto de decomposição da madeira a ter o genoma sequenciado (MARTINEZ et al., 2004).

As características conhecidas a respeito das celobiohidrolase de *P. chrysosporium* (IGARASHI; SAMEJIMA; ERIKSSON, 1998; MUÑOZ et al., 2001; TACHIOKA et al., 2017; UZCATEGUI et al., 1991) tornam essas enzimas um alvo promissor para a prospecção de enzimas de interesse biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi a clonagem e expressão de celobiohidrolases provenientes do DNA genômico de *P. chrysosporium* em *Aspergillus nidulans*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Microrganismos e meios de cultura de manutenção das cepas

O fungo utilizado neste trabalho foi a cepa de *P. chrysosporium* (RP-78). A cepa é mantida a 4 ± 2 °C, sem iluminação, em tubos de ensaio com meio contendo 2 % de extrato de malte, 0,2 % de extrato de levedura e 2 % de ágar contendo um cavaco de madeira.

Para clonagem de genes de interesse foi utilizada a linhagem de *Escherichia coli* TOP10® (Invitrogen). A cepa da bactéria foi mantida em solução estoque (glicerol 70%) acondicionada em ultrafreezer à -80 °C. O crescimento da cepa foi feito em meio Luria-Bertani (LB): 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0. Para meio sólido foi acrescido 2% de ágar.

Aspergillus nidulans ATCC A773 foi empregado nos experimentos de transformação e expressão heteróloga das enzimas. A cepa foi mantida a 4°C em meio mínimo, pH 6.5, contendo 5% de solução de sais (12% de NaNO₃, 1,4% de KCl, 1,4% de MgSO₄.7H₂O, 3,4% de KH₂PO₄), 0,2% de solução de elementos traço (2,2% de ZnSO₄.7H₂O, 1,1% de H₃BO₃, 0,5% de MnCl₂.4H₂O, 0,5% de FeSO₄.7H₂O, 0,16% de CoCl₂.5H₂O, 0,16% de CuSO₄.5H₂O, 0,11% de Na₂MoO₄.4H₂O 5% de Na₂EDTA), 1% de glicose e 2% de ágar. Por se tratar de um mutante deficiente na síntese de bases nitrogenadas, o meio foi acrescido ainda de uracila (2.5 mg/L), uridina (2.5 mg/L) e piridoxina (1 mg/L) (SEGATO et al., 2012). As cepas de *A. nidulans* transformadas com os genes que codificam as proteínas-

alvo foram mantidas em refrigerador após cultivo em meio mínimo sólido, suplementado apenas com piridoxina (1mg/L).

4.2.2 Seleção de genes codificantes de celobiohidrolases, identificação e análise de bioinformática das sequências obtidas

A seleção de CBHs (famílias 6 e 7) de *P. chrysosporium* foi feita através de buscas na literatura (MARTINEZ, et al., 2004; OHM et al., 2014, WYMELENBERG et al., 2006; FLOUDAS et al., 2012) e no banco de dados do JGI (Join Genome Institute). Os genes com funções previstas para as atividades de CBH presentes no genoma de cada fungo foram selecionados como alvo para clonagem e análise da expressão gênica. As sequências gênicas que codificam estas enzimas foram utilizadas para identificação em bancos de dados genômico (NCBI) e proteico (UniProt). As sequências foram então submetidas a análises de bioinformática envolvendo comparação por alinhamento entre as sequências codificadoras. Esses dados estão descritos na tabela A1 no apêndice A desta tese.

A anotação adotada neste trabalho para as sequências encontradas para *P. chrysosporium* será referenciada como PchryGH6 e PchryGH7. As anotações de GH7 serão adicionadas de letras correspondentes a quantidade de cópias encontradas no genoma do fungo e identificada no banco de dados do NCBI.

4.2.3 Clonagem dos genes de celobiohidrolases

4.2.3.1 Extração de DNA genômico

Cerca de 50 mg de micélio (peso úmido) foram macerados em almofariz com auxílio de pistilo, adicionando-se nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um microtubo de centrifuga e foi adicionado 600 µL da solução de extração de DNA (1mL de EDTA 0,5M, 1 mL de SDS 10% e 8 mL de água destilada). Essa mistura foi aquecida á 68°C durante 10 minutos e posteriormente centrifugada a 13000 x g por 5 minutos sendo o sobrenadante obtido transferido para um tubo novo. Ao sobrenadante foi adicionado 40 µL de solução 5M de acetato de potássio. Após misturar por inversão, a solução foi mantida em banho de gelo por 10 minutos. Novamente, a mistura foi centrifugada a 13000 x g por 5 minutos e o sobrenadante

foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1,0 mL de etanol 95% e centrifugado nas mesmas condições anteriores, todavia, o sobrenadante obtido nessa etapa foi descartado e o pellet formado foi lavado duas vezes com etanol 70%. Ao final das lavagens o pellet foi seco ao ar em temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL da solução TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0).

4.2.3.2 Vetor de clonagem e construção dos iniciadores de reação (primers)

O vetor de clonagem utilizado neste trabalho é um plasmídeo sintético *pEXPYR*, aprimorado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rolf Alexander Prade (SEGATO et al., 2012) da Universidade Estadual de Oklahoma. O vetor *pEXPYR* apresenta uma marca de seleção bem definida e estável, a qual consiste na reversão de auxotrofia de uracila e uridina. Para a indução da expressão gênica utilizou-se o promotor *glaAp* de *Aspergillus niger*, sendo a maltose o indutor da expressão.

Após a obtenção das sequências completas dos genes de interesse, estas foram submetidas à análise no servidor SignalP 4.1, disponível *on line* em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (PETERSEN et al., 2011) para identificação do peptídeo sinal, o qual foi excluído da sequência de aminoácidos. Baseado na sequência da proteína sem peptídeo sinal, um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers) dos genes de *P. chrysosporium* foram planejados e encomendados junto a fornecedores especializados (Sigma® - Life Science). Foi adicionado aos primers caudas de nucleotídeos complementares a região onde serão inseridos no vetor de clonagem *pEXPYR*.

4.2.3.3 Amplificação das sequências gênicas e reação de ligação dos fragmentos gênicos ao vetor de clonagem

As sequências codificadoras das celobiohidrolases selecionadas foram amplificadas por PCR com a ação da enzima DNA polimerase de alta fidelidade Phusion™ (New England BioLabs®), utilizando o DNA genômico como molde.

As reações de PCR foram montadas de acordo com os ciclos e os reagentes apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Reações de PCR para amplificação das sequências gênicas de celobiohidrolases.

Etapa			Ciclos	Reação	
1	95 °C	30 seg		Tampão HF Phusion	10 µL
				dNTPs 25 nM	1 µL
	95 °C	10 seg	35 vezes	DMSO	1,5 µL
62	62 °C	30 seg		Phusion DNA polimerase	0,5 µL
	72 °C	2 min		H2O destilada	32 µL
				Primer forward	2 µL
3	72 °C	10 min		Primer reverso	2 µL
				DNA molde	1 µL

Fonte: Arquivo próprio.

As amplificações das sequências gênicas que codificam as proteínas de *P. chrysosporium* sem o peptídeo sinal foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando os marcadores "1 Kb *plus DNA Ladder (Invitrogen)*" como referência. O produto da reação de amplificação foi purificado com o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega), segundo instruções do fabricante.

Para a inserção das sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas no vetor *pEXPLYR*, foi utilizado o sistema Gibson Assembly® Master Mix (GIBSON et al., 2009). Para a reação de ligação foi utilizado 2 µL do vetor *pEXPLYR*, 4 µL do fragmento contendo a sequência gênica e 15 µL do Gibson Assembly® Master Mix. A mistura foi incubada a 50 °C por 1 hora.

4.2.3.4 Inserção dos vetores em células competentes de *E. coli*, identificação das colônias positivas e extração de DNA plasmidial

A inserção do vetor contendo o DNA de interesse (vetor clonado) em *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen) competentes (INOUE et al., 1990) foi feita por choque térmico. Uma fração de 200 µL das células competentes estocadas em tubos de micro centrífuga foram descongeladas em banho de gelo e homogeneizadas. Adicionou-se 20 µL dos produtos da reação de Gibson e então a reação foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. Após isso, a reação foi submetida ao choque térmico em banho maria à 42 °C por 45 segundos. Após esta etapa, os tubos foram imediatamente transferidos para o banho de gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 1 mL de meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 20 mM e glicose 20 mM) aos tubos.

A suspensão de células transformadas foi transferida para tubos Falcon de 15 mL estéreis e incubada à 37 °C durante 1,5 horas sob agitação de 250 rpm. Após esse tempo, a suspensão foi transferida para tubos de 1,5 mL estéreis e centrifugadas. O sobrenadante foi em sua maioria descartado, apenas utilizando-se 200 µL deste para ressuspender o pellet celular. As suspensões foram então inoculadas em placas de Petri contendo meio LB sólido, acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e incubadas por 18 horas à 37 °C.

Para confirmação da presença do fragmento do DNA das celobiohidrolases, as colônias foram submetidas ao PCR de colônia. Para isso 10 colônias de cada transformação foram coletadas e diluídas em 10 µL de água destilada estéril e 1 µL desta suspensão foi utilizado na seguinte reação: 5 µL de tampão HF Phusion, 2 µL de dNTP 2,5 mM, 10 pmol de cada *primer* do vetor (*forward* e *reverso*), 0,25 µL de Phusion e água para completar 25 µL de reação. A reação de PCR foi feita em termociclador *MyCycler* (*Bio-Rad*) nas seguintes descritas na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Reações de PCR para amplificação das sequências gênicas de celobiohidrolases.

Etapa	Ciclos	
1	95°C	5
2	95°C	45 seg
(repetição de 24 vezes)	50 °C	45 seg
	72 °C	2 min e 30 seg
3	72°C	5 min

Fonte: Arquivo próprio.

O produto do PCR foi analisado em gel de agarose 1% (m/v) utilizando os marcadores "1 Kb *plus DNA Ladder* (*Invitrogen*)" como referência. Dentre as colônias bacterianas com resultado positivo para a presença dos genes clonados, uma colônia para cada gene de interesse foi incubada em meio LB líquido (100 µg/mL de ampicilina) durante 16 horas, a 250 rpm e 37 °C para obtenção de biomassa microbiana.

Para a extração do DNA plasmidial com o gene clonado, os cultivos foram centrifugados a 13000 x g por 5 minutos e o pellet formado utilizado para extração do DNA plasmidial utilizando o kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

4.2.4 Expressão heteróloga das celobiohidrolases em *A. nidulans* A773

Os experimentos que visaram a expressão heteróloga das GHs selecionadas de *P. chrysosporium* foram realizados em *Aspergillus nidulans* A773. Os DNAs plasmidiais contendo os genes das proteínas GH6 e GH7 foram utilizados para transformação em protoplastos de *A. nidulans* A773, tal como descrito por Segato et. al (2012) baseado na transformação mediada por PEG (polietilenoglicol). Os transformantes positivos foram isolados pela habilidade de reverter a auxotrofia uridina e uracila da cepa de *A. nidulans* A773 (pyrG89; wA3; pyroA4).

4.2.4.1 Obtenção dos protoplastos

Aproximadamente 10^6 esporos de *A. nidulans* A773 cultivado por 2 dias a 37°C em meio sólido mínimo (com piridoxina, uridina e uracila) foram utilizados como inóculo de cultivo em meio mínimo líquido por 4 horas a 37°C e 180rpm de agitação. A cultura foi subsequentemente filtrada em papel Whatman nº1 e o micélio obtido foi lavado com solução MgSO₄ 0,6 M seguido de lavagem com solução DSPS (KCl 1,1 M, ácido cítrico 0,1M, pH ajustado para 5,8 com KOH e esterilizada por filtração).

O micélio obtido foi transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL estéril e adicionou-se 500 mg de *Lysing enzymes from Trichoderma harzianum* (Sigma L1412), 250 mg de *Lysozyme from Chicken Egg White* (Sigma L7651) e 5 mL da solução DSPS para a completa remoção da parede celular do fungo. A mistura foi incubada à 30°C, 100 rpm por 2 a 3 horas, até ser observado um aumento na fluidez da solução.

Os protoplastos foram recolhidos por filtração em membrana *Miracloth* (Calbiochem®) em funil de Buchner com sucção, onde o resto de parede celular e as células intactas ficaram retidas, coletando assim os protoplastos no filtrado em tubo de centrifuga de 50 ml estéril. Os protoplastos foram recuperados por centrifugação à 3600 x g por 15 minutos. O *pellet* formado foi lavado duas vezes por centrifugação à 3600 x g por 15 minutos, com 45 ml de solução STC50 (sorbitol 1,2 M, Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,5, autoclavado e mantido à 4 °C) para remoção das enzimas de protoplastização. Por fim, o precipitado foi ressuspensionado com 1 mL de STC50 (PUNT; VAN DEN HONDEL, 1992).

4.2.4.2 Transformação e confirmação dos clones transformantes

Para a transformação de *A. nidulans* A773 com os genes de celobiohidrolases de *P. chrysosporium*, 40 µL da solução contendo DNA plasmidial foram adicionados em um tubo estéril de 15 mL. O volume final foi ajustado para 100 µL com STC50 e adicionou-se 200 µL da suspensão contendo os protoplastos. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos e em seguida adicionou-se 2 mL da solução PEG 60% (p/v). Essa solução foi agitada cuidadosamente e mantida à temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período, adicionou-se 8 mL de STC50 e homogeneizou-se a mistura. Em seguida, 2 mL da mistura foi vertida em placas contendo meio mínimo para recuperação de protoplastos (meio mínimo descrito no item 4.1 sem adição de uracila e uridina, acrescido de sorbitol 1,2 M). Incubou-se por 1 dia à 37 °C e após esse período as placas foram invertidas, permanecendo outras 48 horas nas mesmas condições de incubação e finalmente, obtendo-se os clones transformantes (TILBUNR, 1983).

Após a confirmação do evento de integração no genoma do organismo hospedeiro através da visualização de clones transformantes na placa, faz-se necessário uma triagem (*screening*) de vários clones, visando selecionar a melhor linhagem com relação à eficiência de expressão e de secreção da proteína de interesse. O *screening* para detecção da produção das proteínas-alvo foi feito em frascos Erlenmeyer usando meio mínimo com 2% de maltose como indutor a 37°C em condições estáticas por 3 dias. A produção de enzimas foi monitorada por análise do sobrenadante de cultura por meio de eletroforese (SDS-PAGE).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Clonagem de genes de celobiohidrolase de *P. chrysosporium* em *E. coli*

4.3.1.2 Amplificação das sequências gênicas

Foram selecionadas para clonagem e expressão heteróloga as enzimas de *P. chrysosporium* (GH6, GH7.B, GH7.C e GH7.D). Para a amplificação por PCR de cada sequência gênica a partir do DNA genômico dos fungos foram utilizados os iniciadores de reação mostrados na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Iniciadores desenhados para clonagem de celobiohidrolase de *P. chrysosporium*. Orientação do iniciador em relação à sequência a ser amplificada (Fwd = forward, Rev= reverso). As caudas de ligação ao vetor de clonagem estão representadas pelos nucleotídeos em letra minúscula e a região aneladora a sequência do gene está representada em letras maiúsculas.

Gene	Sequência 5'-3'
PchryGH6-Fwd	gcaaatgtgattccaagCAGGCGTCGGAGTGGGGACAG
PchryGH6-Ref	gtcccgtgccgggtaCTACAGCGGCGGGTTGGCAGC
PchryGH7.B-Fwd	gcaaatgtgattccaagCAGCAGGCGGGGACCATCACG
PchryGH7.B-Rev	gtcccgtgccgggtaTTAGATACACTGAGAATAGTCTGCGTGCAGAGACT
PchryGH7.C-Fwd	gcaaatgtgattccaagCAGCAGGTCGGCACCAACACGG
PchryGH7.C-Rev	gtcccgtgccgggtaTTAGTAGCACTGGGAGTAGTCTGCCATGGAATGAG
PchryGH7.D-Fwd	gcaaatgtgattccaagCAACAGGCTGGCACCAACACGGC
PchryGH7.D-Rev	gtcccgtgccgggtaTTAGCTAAGACACTCCGGGCGAGCAGACT

Fonte: Arquivo próprio.

Aos iniciadores foram adicionadas caudas de nucleotídeos para ligação no vetor de clonagem. As caudas foram adicionadas de acordo com a região de ligação ao vetor. A amplificação das sequências de celobiohidrolases a partir do DNA genômico de *P. chrysosporium* não obteve sucesso em diversos testes. Após algumas reações com a troca de alguns parâmetros no ciclo da reação e a reamplificação de produtos obtidos numa primeira reação foi possível obter a amplificação das enzimas GH6, GH7 B e C de *P. chrysosporium* (Figura 4.1).

Figura 4. 1-. Eletroforese em gel de agarose confirmando a amplificação e mostrando os produtos de PCR das sequências de interesse. (1) PchryGH6 com 1645 pb, (2) PchryGH7.B com 1573 pb e (3) PchryGH7.C com 1603 pb amplificados a partir do DNAg. (MM) marcador de pares de base (1kb ladder).

Fonte: Arquivo próprio.

O tamanho predito das sequências gênicas das celobiohidrolases são: 1645 pb (GH6), 1573 pb (GH7_B), 1603 pb (GH7_C). A presença da banda dos fragmentos na região de 1500 pb sugere a amplificação de três das 3 sequência-alvo selecionadas.

4.3.1.2 Clonagem das sequências gênicas de celobiohidrolases de *P. chrysosporium* em *E. coli* TOP10®

Após a confirmação das amplificações das sequências gênicas, foi realizada a ligação com o vetor de expressão *pEXPYR* utilizando o sistema Gibson Assembly. Posteriormente, os plasmídeos resultantes para cada gene-alvo foram então inseridos em *E. coli* TOP10® através da metodologia de *heat shock*, que desestabiliza a membrana plasmática por troca abrupta de temperatura, permitindo que os plasmídeos sejam incorporados à bactéria. Após a transformação, foram selecionadas, ao acaso, algumas colônias de bactérias crescidas em meio LB sólido com ampicilina que corresponde a marca de resistência presente no plasmídeo.

Para a confirmação da presença do inserto na bactéria foi feita uma reação de PCR (PCR de colônia) para a seleção das melhores colônias para transformação fúngica, confirmado por análise de eletroforese em gel de agarose (Figura 4.2).

Figura 4. 2 – Eletroforese em gel de agarose apresentando os resultados dos PCRs de colônia, para confirmação das cepas bacterianas positivas para a presença dos genes-alvo. (1) Pchry_Cel6A (2) Pchry_Cel7B e (3) Pchry_Cel7C. (M) Marcador molecular 1 kb. Cada poço de aplicação do gel corresponde à uma colônia bacteriana.

Fonte: Arquivo próprio.

A transformação com os vetores contendo a GH6 foi a mais efetiva entre as três utilizadas, sendo que as colônias que cresceram com os vetores da GH7 D não apresentaram nenhuma colônia positiva no PCR de colônia. O sucesso na transformação da bactéria com os vetores contendo a sequência da proteína GH7C foi de metade das colônias analisadas e para 7 analisadas para GH7B, duas mostraram a amplificação da sequência-alvo.

Após a clonagem dos genes da GH6, GH7B e GH7C confirmados no PCR de colônia, foi feito crescimento de 1 colônia de cada gene para aumento de biomassa. Então, uma parte da biomassa foi guardada em estoque congelada em glicerol a -80°C e o resto foi centrifugado e utilizado na purificação dos vetores plasmidiais contendo o gene corresponde para cada proteína através de Miniprep.

4.3.2 Expressão heteróloga de celobiohidrolases de *P. chrysosporium* em *A. nidulans*

Após a inserção dos vetores contendo as celobiohidrolases de *P. chrysosporium* em *A. nidulans* A773, as cepas transformantes do fungo foram reconhecidos devido a sua habilidade em crescer sem a presença de uracila e uridina. As cepas foram então submetidos à um screening em meio mínimo na presença de maltose como indutor para análise da secreção das celobiohidrolases. A expressão das proteínas produzidas pelas cepas foi monitorada pela análise do sobrenadante em SDS-PAGE 12%. Não foi possível observar uma banda diferenciada no SDS-PAGE indicando a expressão das enzimas. No caso das cepas, a análise por eletroforese mostra que as cepas recombinantes secretaram diversas proteínas, porém nenhuma delas foi expressa de forma intensa e diferenciada em relação à cepa original com o vetor de clonagem vazio (Figura 4.3). A massa molecular calculada pela sequência putativa da enzima é estimada em 50 kDa.

Figura 4.3 – Fotografias dos SDS-PAGE apresentando os resultados dos screening de *A. nidulans* contendo as sequências das GH6 (lanes 1-8), GH7-B (lanes 9-16) e GH7C (lanes 17-23).

Fonte: Arquivo próprio.

A proteína mais intensa observada na eletroforese apresentou massa molar de 75 kDa, diferindo da predição obtida pela análise de bioinformática (50 kDa). Com estes resultados há uma evidência de que a transformação do gene que codifica esta proteína não foi bem-sucedida ou que há problemas relacionados com a secreção da enzima íntegra.

Quando o vetor é integrado ao genoma do hospedeiro, o resultado esperado é a super-expressão da enzima alvo a partir de indução por maltose (SEGATO et al., 2012). Como diversos transformantes de *A. nidulans* foram obtidos para cada proteína testada foi realizada uma seleção através de *screening* de proteínas secretadas dos clones para detecção do clone com maior expressão proteica. Além disso, esse *screening* também é feito para superar problemas no sítio de ligação randômica frequentemente observado em transformações em fungos do gênero *Aspergillus* como observado por Squina et. al. (2009). Esse problema pode resultar na absorção da parte do vetor que confere resistência ao hospedeiro, contudo não carreando a fração do vetor com a sequência gênica ao DNA genômico, ou seja, o fungo consegue crescer na ausência de uracila e uridina, contudo pode não expressar a proteína-alvo, como observado nos transformantes obtidos neste trabalho.

4.4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo contribuem para o conhecimento existente sobre celulasas em basidiomicetos. A prospecção de celobiohidrolases é fundamental na elucidadação da atividade catalítica destas enzimas para aplicação em processos biotecnológicos industriais. Não foi possível obter a expressão de GH7s e GH6 de *P. chrysosporium* em *A. nidulans*. Embora tenha sido realizada a clonagem das sequências codificadoras de PchryGH6, PchryGH7.B e PchryGH7.C, a partir do DNA genômico do fungo e inserção do vetor contendo os fragmentos em *A. nidulans*.

Na observação da seleção de clones para detecção das proteínas-alvo não foram observadas no meio de cultura nenhuma das celobiohidrolases. Se faz necessário uma averiguação quanto a esse resultado, podendo o hospedeiro ter inserido no seu genoma apenas a região que lhe conferia a capacidade de produzir a uracila e uridina ausentes no meio ou o fragmento contendo íntrons que não foi

processado corretamente pelo fungo. Uma alternativa é a utilização do DNA complementar (cDNA) dos fungos como molde para clonagem, a fim de evitar qualquer erro de processamento pós-transcricional que impeça a secreção da proteína funcional para o meio de cultura.

4.5 REFERÊNCIAS

FERNANDEZ-FUEYO, E. et al. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 14, p. 5458–63, 2012.

IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; ERIKSSON, K.-E. L. Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 1, p. 101–106, 1998.

INOUE et. Preparation and transformation of ultra competent *E. coli* cells. **Gene**. v. 96, p. 23-28, 1990.

LEVIN, L. et al. Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 995–1002, 2007.

MACAULEY-PATRICK, S., M. L. FAZENDA, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v.22, n.4, p.249-70. 2005.

MARTINEZ, D., LARRONDO, L. F., PUTNAM, N., GELPKE, M. D, HUANG, K., CHAPMAN, J., HELFENBEIN, K. G., RAMAIYA, P., DETTER, J. C., LARIMER, F., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B., BERKA, R., CULLEN, D., ROKHSAR, D. Genome sequence of the lignocellulose-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nat. Biotechnol.** v. 22 p.695–700, 2004.

MUÑOZ, I. G. et al. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. **Journal of molecular biology**, v. 314, p. 1097–1111, 2001.

NEVALAINEN, K. M. H.; TE’O, V. S. J.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 468–474, 2005.

OHM, R. A. et al. Genomics of wood-degrading fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 82–90, 2014.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin b and phleomycin resistance markers. **Methods in enzymology**. v. 216, p. 47-57, 2008.

PUNT, P. J. et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 200–206, 2002.

SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 2, p. 100–106, 2012.128

SHARMA, R. et al. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2083-2094, 2009.

SQUINA, F. M. et al. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. **Protein Expression and Purification**, v. 68, n. 1, p. 65–71, 2009.

TACHIOKA, M. et al. Crystal structure of a family 6 cellobiohydrolase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Acta Crystallographica Section: F Structural Biology Communications**, v. 73, n. 7, p. 398–403, 2017.

TILBURN, J. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**. v. 26, p. 205-221, 1983.

UZCATEGUI, E. et al. The 1,4-b-D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*.I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 19, p. 271–286, 1991.

WANG, M.; LU, X. Exploring the synergy between cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* and cellulase from *Trichoderma reesei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p.1–10, 2016.

WYMELENBERG, A. VANDEN et al. Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, n. 5, p. 343–356, 2006.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho foi possível obter extratos enzimáticos de dois fungos de degradação branca, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, para estudo do potencial das enzimas hidrolíticas desses fungos, com destaque para as celobiohidrolases (CBH), enzimas das famílias 6 e 7 das glicosil hidrolases que apresentam grande potencial de uso em processos biotecnológicos. A obtenção dessas proteínas por sistemas de expressão heterólogos em ascomiceto não foi atingida, contudo as informações fornecidas neste trabalho podem servir de guia no desenvolvimento futuro de técnicas que possibilitem uma produção otimizada das CBHs de basidiomicetos.

A análise de abundância das CAZy proteínas secretadas nos extratos de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* mostraram que as glicosil hidrolases relacionadas com a degradação de celulose e hemicelulose foram superexpressas quando cultivados com celulose microcristalina como fonte de carbono. Em especial, foi identificado que as celobiohidrolases foram o grupo de enzimas mais abundantes em ambos extratos enzimáticos. Esses resultados corroboram com diversos estudos desenvolvidos na produção de celobiohidrolases utilizando celulose microcristalina como substrato indutor.

A avaliação da potencialidade da aplicação desses extratos enzimáticos em etapas de hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos é interessante do ponto de vista de melhoramento dos coquetéis atualmente aplicados em processos biotecnológicos de conversão de etanol de segunda geração. O desenvolvimento desse trabalho mostrou que o extrato de *P. chrysosporium* atingiu valores próximos ao obtido com o extrato comercial Cellic® Cte2 quando aplicado em medula de cana-de-açúcar, biomassa que não passou por nenhuma etapa de pré-tratamento e que apresenta baixa recalcitrância devido a seu alto teor de glucana e baixo teor de lignina. Contudo esse perfil não foi observado em substratos pré-tratados, onde a estrutura foi quimicamente modificada, indicando assim que a menor carga de CBH presente nas reações com o extrato de *P. chrysosporium* possa ter penalizado a conversão de glucana do material. Em todos os ensaios em que o extrato foi suplementado com β -glicosidase houve o aumento na conversão de glucana, mostrando assim uma leve inibição da CBH do fungo no extrato enzimático. Essa inibição pode ser devido a baixa atividade enzimática de β -glicosidase do extrato,

corroborando assim com o resultado observado na análise de secretoma, que apontou a ausência de secreção detectada de β -glicosidase no extrato.

O extrato enzimático de *T. versicolor*, mesmo apresentando grande abundância de celobiohidrolases, apresentou menor capacidade de conversão das glucanas dos substratos quando comparado ao extrato comercial Cellic® Cte2. Quando foi suplementado com β -glicosidases, não foi observado aumento na conversão de glucana. A baixa atividade enzimática de CBH detectada no extrato pode ser um dos fatores que não auxiliaram uma boa conversão dos substratos lignocelulósicos. As CBHs de *T. versicolor* são pouquíssimas exploradas na literatura e mais estudos em relação às suas características bioquímicas e estruturais poderiam elucidar a ação dessa enzima em diferentes substratos e aumentar o entendimento dos sistemas hidrolítico de fungos de podridão branca. Além disso, essa baixa atividade de CBH que acarreta baixas conversões de glucana na hidrólise de substratos lignocelulósicos corroboram com as discussões e trabalhos que demonstram o papel-chave da celobiohidrolase na degradação da biomassa vegetal.

A comparação da capacidade de sacarificação de uma CBH purificada de *P. chrysosporium* em relação à CBH de *T. longibrachiatum*, gênero cujas enzimas são largamente aplicadas em processos industriais, também foi avaliada neste trabalho. Foi observado que o comportamento da CBH de *P. chrysosporium* foi semelhante em substratos que possuíam menores teores de celulose cristalina, sofrendo queda na conversão de glucana com o aumento deste teor. Esses resultados estão de acordo com antigos trabalhos que demonstraram que diferenças estruturais entre as CBHs de *P. chrysosporium* e *T. reesei* resultavam em características catalíticas diferentes em substratos puros, como celulose microcristalina e celulose bacteriana. Este é o primeiro trabalho que aplica uma CBH de *P. chrysosporium* sobre substratos lignocelulósicos.

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível concluir que o estudo e a prospecção de enzimas é importante na construção do conhecimento e na elucidação de diferentes perfis de enzimas oriundas de basidiomicetos, que apresentam o mesmo padrão de degradação de biomassa lignocelulósica. A contribuição na pesquisa e desenvolvimento frente à área de hidrólise enzimática é essencial no desenvolvimento de vias mais sustentáveis de produção de biocombustíveis.

REFERÊNCIAS

- ADLER, E. Lignin chemistry – past, present and future. **Wood Science Technology**, v. 11, p 169–218, 1977.
- AGUIAR, A; FERRAZ, A. Mechanisms involved in the biodegradation of lignocellulosic materials and related technological applications. **Química Nova**, v. 34, p. 1729–173, 2011.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, p. 1–11, 2010.
- BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Prog Energy Combust**, v. 47, p. 60-88, 2015.
- BECKHAM, G. T., BOMBLE Y. J., BAYER E. A.; HIMMEL, M. E., Crowley M. F.. Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of Cellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 1–8, 2010.
- BENTIL, J. A. et al. Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 5827–5839, 2018.
- BLANCHETTE, R.A: Delignification, by wood-decay fungi. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 29, p. 381–403, 1991.
- CASADO-LÓPEZ, S. et al. Draft Genome Sequences of Three Monokaryotic Isolates of the White-Rot Basidiomycete Fungus *Dichomitus squalens*. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 18, p. e00264-19, 2 maio 2019.
- CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.15, p.1-8, 2009.
- CHUNDAWAT, S.P.S.; BECKHAM, G.T.; HIMMEL, M.E.; DALE, B.E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 2, p. 121–145, 2011.
- COSTA, T. H. F. et al. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202–211, 2013.
- COSTA, T. H. F.; VEGA-SÁNCHEZ, MIGUEL E.; MILAGRES, A. M. F.; SCHELLER, H. V.; FERRAZ, A. Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 99, 2016.
- COUTURIER, M. et al. Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. **Nature Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 306–310, 2018.

CULLEN, D., 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. **J. Biotechnol.** 53, 273–289, 1997.

CUNHA, F. M. et al. On-Site Production of Enzymatic Cocktails Using a Non-conventional Fermentation Method with Agro-Industrial Residues as Renewable Feedstocks. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 2, p. 517–526, 2017.

DIVNE, C., J. STÅHLBERG, T. REINIKAINEN, L. RUOHONEN, G. PETTERSSON, J. K. C. KNOWLES, T. T. TEERI, AND T. A. JONES. The 3-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 265 p. 524–528, 1994.

DIVNE, C., STÅHLBERG, J., TEERI, T. T, JONES, T. A. 1998. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **J Mol Biol** v. 275, p.309– 325, 1998.

DOS SANTOS, A. C. et al. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 518–531, 2019.

ERIKSSON, K.; JOHNSRUD, S. C.; FOREST, S. Mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulen* turn with increased cellulase and β -D-glucosidase production. **Enzyme Microb. Technol.** v. 5, p. 425–429, 1983.

EVANS, C. S; DUTTON, M.V.; GUILLEN, F.; VENESS, R. G. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiol Rev**, v. 13, p. 235–240, 1994.

FALKOSKI, D. L. et al. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 6, p. 1586–1603, 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E. AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul**: EDUCS, 2010. cap. 6, p. 215-242.

FERRAZ, A.; COSTA, T. H. F.; SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A. M. F. Mapping of cell wall components in lignified biomass as a tool to understand recalcitrance. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed.). **Biofuels in Brazil**. New York, Springer, cap. 9, p. 173-202. 2014.

FILIATRAULT-CHASTEL, C. et al. AA16, a new lytic polysaccharide monooxygenase family identified in fungal secretomes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2019.

FLOUDAS, D.; BINDER, M., RILEY, R., BARRY, K., BLANCHETTE, R. A., HENRISSAT, B., MARTÍNEZ, A. T., OTILLAR, R., SPATAFORA, J. W., YADAV, J.

S, et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**. v. 336, p.1715–1719, 2012.

GAO, D. et al. Lignin triggers irreversible cellulase loss during pretreated lignocellulosic biomass saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2014.

GASKELL, J. et al. Draft genome sequence of a monokaryotic model brown-rot fungus *Postia* (*Rhodonia*) *placenta* SB12. **Genomics Data**, v. 14, n. August, p. 21–23, 2017.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase activities. **International union of pure and applied chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GRASSICK, A. et al. Three-dimensional structure of a thermostable native cellobiohydrolase, CBH IB, and molecular characterization of the cel7 gene from the filamentous fungus, *Talaromyces emersonii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 22, p. 4495–4506, 2004.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419–425, 2011.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Curr Opin Plant Biol**, v. 11, p. 349-55, 2008.

HEMSWORTH, G. R. et al. Discovery of a new family of lytic polysaccharide mono-oxygenases. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 122–126, 2014.

HENRIKSSON, G. Lignina. In: In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology**. Stockholm. v. 1, cap. 6, p. 121 - 145., 2009.

HENRISSAT, B. 1991. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**. v. 280, p.309–316.

HON, D. N.-S., SHIRAISHI, N. **Wood and Cellulosic chemistry**. 2nd. Boca Raton, FL, CRC Press, 2001.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 45, n. 5, p. 1–12, 2012.

IGARASHI, K. et al. Characterization of an endoglucanase belonging to a new subfamily of glycoside hydrolase family 45 of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 18, p. 5628–5634, 2008.

IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; ERIKSSON, K. E. L. Cellobiose dehydrogenase enhances *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving

product inhibition. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 1, p. 101–106, 1998.

ILME, M. et al. Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1298–1306, 1997.

ISROI, A.; MILLATI, R.; SYAMSIH, S.; NIKLASSON, C.; CAHYANTO, M.N.; LUNDQUIST, K.; TAHERZADEH, M.J. Biological pretreatment of lignocelluloses with white- rot fungi and its applications: A review. **Bioresources**, v. 6, p.5224–5259, 2011.

JOHANSSON, T.; NYMAN, P. O.; CULLEN, D. Differential regulation of mnp2, a new manganese peroxidase-encoding gene from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 2077–2080, 2002.

KERSTEN, P.; CULLEN, D. Fungal Genetics and Biology. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 44, p.77–87, 2007

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. Dictionary of the fungi, 10th. Cab International Wallingford., 2008

KIRK, T.K. Degradation and conversion of lignocelluloses. In: SMITH J.E.; BERRY, D.R.; KRISTIANSEN, B. The filamentous fungi. **Fungal technology**. New York: Edward Arnold, p. 266-295, 1983.

KURAŠIN, M.; VÄLJAMÄE, P. Processivity of cellobiohydrolases is limited by the substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 169–177, 2011.

LADISCH, M.R.; LIN, K.W.; VOLOCH, M.; TSAO, G.T. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme Microbial and Technology**, v.5, p.82–102, 1983.

LAHJOUJI, K. et al. Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 337–346, 2007.

LEE, K.; MOON, S.H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 102, p. 261-268, 2003.

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 41, p. 1–14, 2013.

LEVY, J.F. The natural history of the degradation of wood. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London. A, v. 321, p. 423 - 433, 1987.

LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 490–495, 2014.

LUNDELL, T. K.; MÄKELÄ, M. R.; HILDÉN, K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - Ecological, functional and phylogenetic review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 5–20, 2010.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p. 506, 2002.

MÄKELÄ, M. R. et al. Draft Genome Sequence of the Basidiomycete White-Rot Fungus *Phlebia centrifuga*. **Genome Announcements**, v. 6, n. 14, p. 17–18, 2018.

MARTINEZ, D., LARRONDO, L. F., PUTNAM, N., GELPKE, M. D., HUANG, K., CHAPMAN, J., HELFENBEIN, K. G., RAMAIYA, P., DETTER, J. C., LARIMER, F., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B., BERKA, R., CULLEN, D., ROKHSAR, D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nat. Biotechnol.** v. 22 p.695–700, 2004.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin contents. **Biotechnology for biofuels**, v.4, p. 1–10, 2011.

MCCARTER, J. D.; STEPHEN WITHERS, G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 885–892, 1994.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

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, 2012.

MOMENI M. H., et al. Structural, biochemical, and computational characterization of the glycoside hydrolase family 7 cellobiohydrolase of the tree-killing fungus *Heterobasidion irregulare*. **J. Biol. Chem.** v.288, n.8 p.5861–5872, 2013.

MUNOZ, I. G., UBHAYASEKERA, W., HENRIKSSON, H., SZABO, I., PETTERSSON, G., JOHANSSON, G., MOWBRAY, S. L., STAHLBERG, J. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. **J. Mol. Biol.** v. 314, p.1097–1111, 2001.

OHM, R. A. et al. Genomics of wood-degrading fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, n. April 2016, p. 82–90, 2014.

ÖNNERUD, H.; ZHANG, L.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation. **The Plant Cell**, Rockyville, v.14, p. 1953-1962, 2002.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p.69–80, 2000.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

RAHIKAINEN, J.; MIKANDER, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; LAPPAS, A.; VIIKARI, L.; KRUUS, K. Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Residual Lignins From Softwood—Study of Enzyme Binding and Inactivation on Lignin-Rich Surface. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, p. 2823–2834, 2011.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RÄTTÖ, M.; RITSCHKOFF, A. C.; VIIKARI, L. The effect of oxidative pretreatment on cellulose degradation by *Postia placenta* and *Trichoderma reesei* cellulases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 53–57, 1997.

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Science direct xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.

RILEY, R.; SALAMOV, A. A.; BROWN, D. W.; NAGY, L. G.; FLOUDAS, D.; HELD, B. W.; LEVASSEUR, A.; LOMBARD, V.; MORIN, E.; OTILLAR, R.; LINDQUIST, E. A.; SUN, H. W.; LABUTTI, K. M.; SCHMUTZ, J.; JABBOUR, D.; LUO, H.; BAKER, S. E.; PISABARRO, A. G.; WALTON, J. D.; BLANCHETTE, R.A.; HENRISSAT, B.; MARTIN, F.; CULLEN, D.; HIBBETT, D. S.; GRIGORIEV, I. V. 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, 2014.

RYTIOJA, J. et al. Saccharification of lignocelluloses by carbohydrate active enzymes of the white rot fungus *Dichomitus squalens*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2015.

SABBADIN, F. et al. An ancient family of lytic polysaccharide monooxygenases with roles in arthropod development and biomass digestion. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

SAMMOND, D. W. et al. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 30, p. 20960–20969, 2014.

SANTOS, V. T. DE O. et al. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. November 2017, p. 722–730, 2018.

SARATALE, G. D.; KSHIRSAGAR, S. D.; SAMPANGE, V. T.; SARATALE, R. G., OH, S. E., GOVINDWAR, S. P.; OH, M. K. Cellulolytic enzymes production by utilizing agricultural wastes under solid state fermentation and its application for

biohydrogen production. **Appl Biochem Biotechnol.** v.174, n. 8, p. 2801–2817, 2014.

SEDARATI, M.R.; KESHAVARZ, T.; LEONTIEVSKY A. A.; EVANS C.S. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. **Electron J Biotechnol**, v. 6, p.104–114, 2003.

SEGATO, F. et al. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588–613, 2014.

SELIG, M. J. et al. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 6, p. 1333–1339, 2007.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, n. 7, 2011.

STÅHLBERG, J.; DIVNE, C.; KOIVULA, A.; PIENS, K.; CLAEYSSSENS, M.; TEERI, T. T.; JONES, T. A. Activity studies and crystal structures of catalytically deficient mutants of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **J Mol Biol** n. 264, p. 337–349, 1996.

STAMBUK, B.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 18-926., 2008.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305–311, 2001.

SZABÓ, I. J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. Optimized cellulase production by *Phanerochaete chrysosporium*: Control of catabolite repression by fed-batch cultivation. *Journal of Biotechnology*, v. 48, n. 3, p. 221–230, 1996.

TACHIOKA, M. et al. Crystal structure of a family 6 cellobiohydrolase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Acta Crystallographica Section: F Structural Biology Communications**, v. 73, n. 7, p. 398–403, 2017.

TANAKA, H., ITAKURA, S., ENOKI, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **J Biotechnol** v. 75, p. 57–70, 1999.

TAYLOR, C. B. et al. Computational investigation of glycosylation effects on a family 1 carbohydrate-binding module. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 5, p. 3147–3155, 2012.

TEERI, T. T., KOIVULA, A., LINDER, M., WOHLFAHRT, G., DIVNE C, JONES, T. A. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? **Biochem Soc Trans** v. 26, p.173–178, 1998.

THEERACHAT, M.; EMOND, S.; CAMBON, E.; BORDES, F.; MARTY, A. NICAUD, J. et al. Engineering and production of laccase from *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresour Technol**, p. 267–274, 2012.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochem Eng J**. v. 81, p.146–161, 2013.

UZCATEGUI, E. et al. The 1,4-b-D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 19, p. 271–286, 1991.

UZCATEGUI, E.; EK, B.; PETTERSSON, G. The 1,4-β-D-glucan glucanohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. Re-assessment of their significance in cellulose degradation mechanisms. **Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 143–159, 1991.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An Oxidative Enzyme Boosting the. **Science**, v. 330, n. October, p. 219–222, 2010.

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. 1–12, 2016.

VÁRNAI, A. et al. Effects of enzymatic removal of plant cell wall acylation (acetylation, p-coumaroylation, and feruloylation) on accessibility of cellulose and xylan in natural (non-pretreated) sugar cane fractions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIHKARI, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 30, 2013.

VARROT, A. et al. Structural basis for ligand binding and processivity in cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. **Structure**, v. 11, n. 7, p. 855–864, 2003.

VON OSSOWSKI, I. et al. Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. **Journal of Molecular Biology**, v. 333, n. 4, p. 817–829, 2003.

VU, V. V. et al. A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 38, p. 13822–13827, 2014.

WANG, M.; LU, X. Exploring the synergy between cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* and cellulase from *Trichoderma reesei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–10, 2016.

WENDE, G.; FRY, S.C. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of Grass xylans. **Phytochemistry**, v.44, p.1011-1018, 1997.

WRIGHT, J.D.; WYMAN, C.E.; GROHMANN K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose – process evaluation. **Applied. Biochemistry Biotechnology**, v. 18, p.75–90, 1988.

WYMAN, C. E. et al. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. **Bioresource technology**, v. 96, n. 18, p. 2026–32, dez. 2005.

WYMELENBERG, A. V; MINGES, P.; SABAT, G.; MARTINEZ, D.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; GRIGORIEV, I.; SHAPIRO, H.; PUTNAM, N.; BELINKY, P.; DOSORETZ, C.; GASKELL, J.; KERSTEN, P; CULLEN, D. Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. **Fungal Genetics and Biology**, v.43, p. 343–356, 2006.

YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, n. 4, p. 421–450, 2011.

ZHANG, H.D., XU, S.H. WU, S.B. Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. **Bioresource Technology**. v. 143, p. 391-396, 2013.

ZHANG, L. et al. The dual effects of lignin content on enzymatic hydrolysis using film composed of cellulose and lignin as a structure model. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 761–769, 2016.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.

APÊNDICE A

Informações sobre as celobiohidrolases de *P. chrysosporium* e *T. versicolor* encontradas no genoma dos fungos presentes no JGI.

Tabela A1. Números de acesso das sequências de celobiohidrolases de *P. chrysosporium* nos bancos de dados do JGI, NCBI e Uniprot.

Gene	Protein ID ^a	GenBank	UniProt	MM* (kDa)
PchryGH6	2965119	AAB32942.1	Q02321	46,37
PchryGH7.A	2971598	CAA38275.1	Q01762	47,34
PchryGH7.B	137042	CAA38275.1	Q01763	50,08
PchryGH7.C	2971601	AAB46373.1	P13860	52,94
			Q09431/Q7L	56,3
PchryGH7.D	137372	CAA82761.1	HI2	
			Z11727/Q01	53,84
PchryGH7.E	3024803	CAA77790.1	599	

^a“Protein ID” é relativa as proteínas descritas no genoma de *P. chrysosporium* RP-78 v2.2 obtidas a partir do banco de dados do JGI (<http://jgi.doe.gov/>).

* MM estimada no Expasy (www.expasy.org).

Fonte: Próprio autor.

Tabela A2. Números de acesso das sequências de celobiohidrolases de *T. versicolor* nos bancos de dados do JGI, NCBI e Uniprot.

Sequência	Protein ID ^a	GenBank	GenBank ^b	UniProt	MM ^c (kDa)
Trave_GH6	63826	XP_008036628.1	EIW60188.1	A0A1M2VM95*	47,34
Trave_GH7. A	125941	XP_008039631.1	EIW57445.1	AOA1M2VHY2*	47,03
Trave_GH7. B	110790	XP_008032721.1	EIW64126.1	AOA1M2W3H5 *	48,95
Trave_GH7. C	112163	XP_008302771.1	EIW64214.1	AOA1M2W7X9 *	49,04
Trave_GH7. D	124366	XP_0080388491. 1	EIW58677.1	A0A1M2VQR0*	47,34

^a Protein ID é relativa as proteínas descritas no genoma de *T. versicolor* v1.0 obtidas a partir do banco de dados do JGI (<http://jgi.doe.gov/>).

^b Número obtido restringindo a obtenção de modelos hipotéticos de codificação de proteínas.

^c MM estimada no Expasy (www.expasy.org).

* O número de acesso obtido é referente a espécie *Trametes pubescens*.

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE B

Primers utilizados nos ensaios de real-time PCR

Tabela B1. Iniciadores dos genes de celobiohidrolase de *P. chrysosporium* e tamanho do amplicon a ser obtido na reação qPCR. Orientação do iniciador em relação à sequência a ser amplificada (Fwd = *foward*, Rev= *reverso*).

Gene	Iniciadores (5'-3')	Tamanho do amplicon
PchryGH6_Fwd	GGAGAGTTCAGCATTGCCAAC	93 pb
PchryGH6_Rev	GCGGACATCAGGGAAGTGT	
PchryGH7_A-Fwd	GTGTGTAAGTTAGATTCGTGGTGT	143 pb
PchryGH7_A-Rev	TTCGATACCATGGGCTGACGAC	
PchryGH7_B-Fwd	GGATCCGCACCTGCATCTTCA	140 pb
PchryGH7_B-Rev	CACTGAGAATAGTAGATATTGAGAG	
PchryGH7_C-Fwd	GCGGGGGTTGGATTTGTTGCAC	84 pb
PchryGH7_C-Rev	AGGAACAAAGAAATATGATTTGAGGT	
PchryGH7_D-Fwd	TGCAGCCTCGAAAATAGCAGACT	111 pb
PchryGH7_D-Rev	GTATGTGTGCATTTACGGATCG	
PchryGH7_E-Fwd	TTGGCGCAGACGGGATTTTCC	140 pb
PchryGH7_E-Rev	CACGCAAACCTACCCCTTTCCA	
Pchry_act-Fwd	ATGTGCAAGGCTGGCTTTG	67 pb
Pchry_act-Rev	GGCGACCAACGATGGATG	

Fonte: Próprio autor.

Tabela B2. Iniciadores dos genes de celobiohidrolase de *T. versicolor* e tamanho do amplicon a ser obtido na reação qPCR. Orientação do iniciador em relação à sequência a ser amplificada (Fwd = *foward*, Rev= *reverso*).

Gene	Sequência (5'→3')	Tamanho do amplicon
Trave_GH6_Fwd	GGTTCTCCTACGACCGTCTC	109 pb
Trave_GH6_Rev	AGCAGAGTAGTAGGGGCTCA	
Trave_GH7.A_Fwd	CCGTCACCTTCTCGAACATCA	109 pb
Trave_GH7.A_Rev	AAGCGATGGGTGAGTGGAAG	
Trave_GH7.B_Fwd	ACCGTCGTCTTCTCCAACAT	124 pb
Trave_GH7.B_Rev	GAGAGGAACATCTAGGGTGGC	
Trave_GH7.C_Fwd	GAGAACAGCGAGGCGAACT	143 pb
Trave_GH7.C_Rev	CGGTATGTCTGCGATGATGGT	
Trave_GH7.D_Fwd	AGTTCGGTCCTATCGGCTCT	104 pb
Trave_GH7.D_Rev	ACAGGCGTCTACACATCACC	
Trave_actina_Fwd	AGGTCAAGATCGTTGCTCCC	112 pb
Trave_actina_Rev	CGTCGTAACCTGCTTCGAG	

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE C

Tabela C1- Proteínas identificadas por LC MS/MS nas amostras de cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* em meio basal com 2 % de avicel.

#	Função Biológica	Protein ID (JGI)	Função prevista	CAZy	CBM	Pept. sinal	MM ¹ (kDa)	pI ²	Abundância normalizada	Abundância Relativa	Score	"Peptide count"
1	Degradação de celulose	137372	cellobiohydrolase I (cel7D)	GH7 - CBM1	CBM1	SIM	58	4,9	29523587	295.2	188	17
2		2971601	cellobiohydrolase I (cel7C)	GH7		SIM	55	5,0	5429434	54.3	171	11
3		2985730	Manganese dependent endoglucanase Eg5A	GH5_subf5	CBM1	SIM	40	5,0	5426599	54.3	171	11
4		2981757	endoglucanase	GH5_subf5	CBM1	SIM	42	4,7	2729810	27.3	33	6
5		1416762	endoglucanase (cel12A)	GH12		SIM	27	4,7	1882967	18.8	24	2
6		2965119	cellobiohydrolase II (cel6)	GH6	CBM1	SIM	48	5,0	1368283	13.7	101	9
7		3004240	endoglucanase V-like protein	GH45		SIM	21	5,6	1141146	11.4	40	4
8		3024803	cellobiohydrolase I (cel7E)	GH7	CBM1	SIM	54	4,2	1020189	10.2	92	8
9		2976245; 2976248	cellobiohydrolase I (cel7F/G)	GH7	CBM1	SIM	54	4,5	406054	4.1	44	9
10	Degradação de hemicelulose	2905606	endo-1,4-B-xylanase B	GH11	CBM1	SIM	30	5,7	6271015	62.7	60	7
11		3030351	endo-1,4-B-xylanase	GH10	CBM1	SIM	40	6,3	5429014	54.3	181	19
12		2903539	endo-1,4-B-xylanase A	GH10	CBM1	SIM	43	5,2	1333792	13.3	147	13
13		2912797	xyloglucanase Xgh74B	GH74	CBM1	SIM	88	5,0	937653	9.4	143	11
14		2983729	endo-1,4-beta-xylanase C	GH10	CBM1	SIM	42	4,7	898336	9.0	91	7
15		2955500	endo-1,4-beta-D-mannanase (Man5C)	GH5_subf7	CBM1	SIM	48	4,2	672176	6.7	34	3
16		2927412	xyloglucanase	GH74		SIM	79	4,7	361045	3.6	108	11
17		140501	β -mannanase, <i>man5D</i>	GH5_subf7	CBM1	SIM	48	4,8	219148	2.2	66	6
18		2933015	arabinanase	GH43		SIM	33	4,7	146626	1.5	34	4
19		133070	beta-xylosidase	GH43		SIM	34	5,0	70804	0.7	14	2
20		3024004	endo-1,4-B-xylanase	GH10	CBM1	SIM	40	5.3	45721	0.5	82	8

(continua)

(Continuação)

#	Função Biológica	Protein ID (JGI)	Função prevista	CAZy	CBM	Pept. sinal	MM ¹ (kDa)	pI ²	Abundância normalizada	Abundância Relativa	Score	"Peptide count"
21	Degradação de pectina	2916357	polygalacturonase	GH28	CBM1	SIM	54	5,5	1219945	12.2	128	9
22		2904202	polygalacturonase	GH28		SIM	38	4,8	915410	9.2	68	5
23	Esterases	126075	acetil-xilana esterase	CE1	CBM1	NÃO*	36	5,9	4084767	40.8	118	10
24		2909957	GDSL-like Lipase/acilhidrolase	CE16		SIM	46	5,5	440868	4.4	80	9
25		2918304	acetylerase c/ CBM1	CE15	CBM1	SIM	47	5,5	484023	4.8	42	4
26		2983171	acetil xilana esterase	CE1	CBM1	SIM	32	6,3	169550	1.7	33	5
27		2967260	acetylerase c/ CBM1	CE16	CBM1	SIM	39	4,5	68761	0.7	22	2
28	Oxidoreductases	2980158	Lytic polysaccharide monooxygenase	AA9	CBM1	SIM	32	4,3	2258941	22.6	43	
29		3030424	CDH	AA3-subf1		SIM	82	5,1	1672623	16.7	84	10
0.3		2975821	Lytic polysaccharide monooxygenase	AA9		SIM	25	7,0	1470538	14.7	23	2
31		3027731	Lytic polysaccharide monooxygenase	AA9	CBM1	SIM	33	5,0	856387	8.6	16	1
32		2908293	Lytic polysaccharide monooxygenase	AA9		SIM	25	4,6	335730	3.4	42	3
33		3029242	Lytic polysaccharide monooxygenase	AA9	CBM1	SIM	34	5,5	193842	1.9	54	4
34		3005492	Lytic polysaccharide monooxygenase	AA9	CBM1	SIM	33	4,8	189459	1.9	15	1
35		2916462	Aldehyde dehydrogenase			NÃO*	9	6,7	124165	1.2	13	1
36	Degradação de amido	3029525	Maltase glucoamylase	GH31		SIM	106	5,4	239116	2.4	105	10
37		2909460	glucan 1,4-alpha-glucosidase activity	GH15	CBM20	SIM	61	5,2	222768	2.2	79	7

(continua)

(Conclusão)

#	Função Biológica	Protein ID (JGI)	Função prevista	CAZy	CBM	Pept. sinal	MM ¹ (kDa)	pI ²	Abundância normalizada	Abundância Relativa	Score	"Peptide count"
38	Fungal	3006885	glucan 1,3-beta-glucosidase	GH55		SIM	82	5,4	8170098	81.7	168	21
39	cell wall	138739	β-Glucanase	GH131	CBM1	SIM	34	5,2	3215119	32.2	39	3
40	degradation	2983557	Thaumatococcus			SIM	27	4,8	795255	8.0	65	5
41		3003339	Thaumatococcus			SIM	27	4,32	381054	3.8	40	3
42		2978123	Chitinase	GH18		NÃO	52	6,19	216254	2.2	7	1
43	Proteases	3001741	protease da família S53			SIM	58	4,75	171224	1.7	30	3
44	ou peptidases	2919778	Aspartyl protease			SIM	44	5,19	195838	2.0	19	3
45	Outras	7029	Lactonase			NÃO*	37	5,05	337681	3.4	25	3
46		131440	Carbohydrate-binding module family 1 protein	CBM 1		NÃO*	23	4,33	783042	7.8	24	2
47		2962130	Cerato-platanin			SIM	15	4,69	1868120	18.7	16	1
48		3025148	Predicted mutarotase/aldose 1-epimerase			SIM	42	5,25	1681580	16.8	77	7
49	Proteínas	2968041	Hypothetical protein			SIM	14	6,71	1296370	13.0	55	4
50	hipotéticas	3024249	Hypothetical protein			SIM	15	5,79	773540	7.7	16	1
51		3028031	Hypothetical protein			SIM	13	4,17	629156	6.3	16	1
52		2890924	Hypothetical protein			NÃO*	13	6,04	489664	4.9	57	5
53		2007651	Hypothetical protein Domain of unknown function (DUF1793)			SIM	28	5,1	239954	2.4	60	6
54		3002168	/Hypothetical protein			NÃO*	74	5,53	120107	1.2	80	8
55		2984123	glicosil hidrolase (Hypothetical protein)	Domínio GH30		SIM	53	6,29	112023	1.1	30	3
56		1127251	Hypothetical protein			NÃO*	20	8,86	53339	0.53	12	2

¹MM: massa molar²pI teórico calculado em:

(*) apresenta sinal não clássico de secreção

Fonte: Arquivo próprio.

Tabela C2- Proteínas identificadas por LC MS/MS nas amostras de cultivo de *Trametes versicolor* em meio basal com 2 % de avicel.

#	Função Biológica	Protein ID (JGI)	Função prevista	CAZy	CBM	Peptídeo sinal	MM ¹ (kDa)	pI ²	Abundância normalizada	Abundância Relativa	Score	"Peptide count"
1	Degradação De celulose	112163/125941	Cellobiohydrolase I (cel7C)	GH7		SIM	48	4,6	21918474	219	212	20
2		110790	Cellobiohydrolase I (cel7B)	GH7		SIM	49	4,9	5864435	59	270	30
3		33056	endoglucanase	GH5-Subf 5	CBM1	NÃO*	38	4,5	4948646	49	107	7
4		63826	Cellobiohydrolase II	GH6	CBM1	SIM	47	4,9	2627276	26	112	10
5		68557	β-glucosidase	GH3	CBM1	SIM	85	5,5	2597407	26	206	23
6		168018	endoglucanase V-like protein	GH45		SIM	20	5,8	2125222	21	28	2
7		150608	endoglucanase	GH5-Subf 5	CBM1	SIM	41	4,9	935620	9	23	2
8		124366	Cellobiohydrolase I (cel7D)	GH7		SIM	49	4,2	837849	8	96	9
9		24300	endoglucanase	GH45		SIM	30	5,8	598255	6	14	2
10		151848	endoglucanase	GH5_subf5	CBM1	SIM	44	4,3	120483	1	28	4
11	Degradação De hemicelulose	38102	Endo-1,4-beta-xylanase C	GH10	CBM1	SIM	42	4,7	16640046	166	217	19
12		161823	mananase	GH5- Subf7	CBM1	SIM	47	4,6	4534317	45	52	4
13		50178	Xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase	GH12		SIM	27	4,7	2524757	25	38	2
14		59914	α-L-arabinofuranosidase	GH51		SIM	69	5,2	1934909	19	137	9
15		48717	endo-xilanase putativa	GH10	CBM1	SIM	43	4,7	602890	6	96	9
16		136117	xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase	GH12		SIM	26	5,0	583979	6	27	2
17		144893	β-xylanase	GH10	CBM1	SIM	40	6,5	431000	4	68	6
18		145953	galactan 1,3-β-galactosidase	GH43	CBM35	SIM	47	5,3	414608	4	63	7
19		75494	α-1,2-mannosidase	GH92		SIM	89	4,8	373114	4	108	11

(continua)

(Continuação)

#	Função Biológica	Protein ID (JGI)	Função putativa	CAZy	CBM	Peptídeo sinal	MM ¹ (kDa)	pI ²	Abundância normalizada	Abundância Relativa	Score	"Peptide count"
20	Degradação	143650	arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase	GH53		SIM	37	5,6	3242906	32	126	15
21	De	112178	β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	GH74	CBM1	SIM	87	4,9	709447	7	126	11
22	pectina	147020	glucosylceramidase	GH30 subf3		SIM	59	4,9	310663	3	62.	6
23		21825	α -L-rhamnosidase	GH78		NÃO*	31	5,4	19785	0	6	1
24	Esterases	161949	acetylxyln esterase	CE1	CBM1	SIM	39	7,5	1363882	14	63	5
25		112899	acetilxilana esterase	CE1 -	CBM1	NÃO*	40	5,5	567720	6	61	6
26		141077	acetylxyln esterase	CE1	CBM1	SIM	38	5,3	531490	5	34	3
27		138138	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase	CE16		NÃO*	42	5,2	325609	3	50	6
28		109109	Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase	CE1		SIM	53	5,1	228412	2	71	6
29	Oxidoreductases	45408	CDH-cyt Class-II	AA8	CBM1	SIM	28	4,4	1464302	15	7	1
30		73596	CDH	AA3	CBM9	SIM	81	4,9	3587252	36	173	17
31		162601	LPMO putativa	AA9		SIM	24	6,5	470894	5	39	4
32	Starch	141481	β -fructofuranosidase (invertase)	GH32		SIM	58	4,5	619649	6	66	5
33	degradation	159574	α -D-galactosidase (melibiase)	GH27		SIM	47	4,7	465263	5	75	7
34		110860	α -glucosidase	GH31		SIM	105	5,0	120932	1	89	11
35		131501	1, 2-alpha-mannosidase	GH47		SIM	59	4,6	100276	1	21	3
36	Proteases	166188	serine-type peptidase activity			SIM	58	4,6	649523	6	81	6
37	or peptidases	64339	Aspartyl protease			NÃO*	44	4,9	185973	2	7	1
38		147958	serine-type peptidase activity			SIM	63	5,0	202070	2	65	6
39		22113	Proline-specific peptidase			NO	32	5,8	114400	1	11.72	2

(continua)

(Conclusão)

	Função Biológica	Proteína ID (JGI)	Função putativa	CAZy	CBM	Peptídeo sinal	MM ¹ (kDa)	pI ²	Abundância normalizada	Abundância Relativa	Score	"Peptide count"
40	Degradação da parede celular	175614	broad specificity exo-β-1,3/1,6-glucanase with endo-β-1,4-glucanase activity	GH131		SIM	33		816455	8	60	4
41		46975	broad specificity exo-β-1,3/1,6-glucanase with endo-β-1,4-glucanase activity	GH131	CBM1	SIM	35	4,8	401148	4	15	1
42		62247	broad specificity exo-β-1,3/1,6-glucanase with endo-β-1,4-glucanase activity	GH131		SIM	28	5,8	341431	3	39	3
43		31361	Thaumatin			SIM	27	4.5	229169	2	7	1
44		47923	chitinase	GH18		SIM	35	4.4	98359	1	32	3
45	Outras	66045	isomerase YbhE			NÃO*	37	5.8	326544	3	50	5
46		87426	Cerato-platanin			NÃO*	12	4.1	797754	8	15	1
47		67924	Ribonuclease T2 family			SIM	40	5.1	294247	3	50	5
48		27714	Aldose 1-epimerase			SIM	42	4,9	133357	1	28	3
49		83494	Tam3-transposase (Ac family)			NO	23	6.6	30755	0	5	1
50	Proteínas hipotéticas	66957	hypothetical protein	GH30		SIM	52	5,6	731709	7	83	11
51		60827	hypothetical protein (Phosphoesterase)			SIM	50	4.4	347751	3	33	2
52		47220	hypothetical protein			SIM	63	5.7	273984	3	29	3
53		30879	hypothetical protein			SIM	39	4.5	227144	2	20	3
54		53267	hypothetical protein			NO	19	5.7	201477	2	7	1
55		43111	hypothetical protein			NÃO*	6	4.8	142380	1	6	1
56		27555	hypothetical protein			NÃO*	15	4.2	80313	1	14	1
57		32177	hypothetical protein			NO	19	9.3	26888	0	18	2
58		47228	hypothetical protein			SIM	122	5.5	19574	0	23	2

¹MM: massa molar²pI teórico calculado em:

(*) apresenta sinal não clássico de secreção

Fonte: Arquivo próprio.