UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DANIELA DE LUCENA PEDROSO

Enzimas Oxidorredutases do fungo *Pestalotiopsis* sp.

São Paulo

2020

DANIELA DE LUCENA PEDROSO

Enzimas Oxidorredutases do fungo *Pestalotiopsis* sp.

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em oito de julho de 2020. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde

São Paulo

2020

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.

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO
(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)
CRB-8 4936

Pedroso, Daniela De Lucena
Enzimas oxidorredutases do fungo *Pestalotiopsis* sp. / Daniela De Lucena Pedroso ; orientador, Felipe Santiago Chambergo Alcalde - 2020
106 f : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo
Versão corrigida

1. Biologia molecular. 2. Fungos. 3. Enzimas oxirredutoras. 4. Lignina. 5. *Pestalotiopsis* sp. I. Chambergo Alcalde, Felipe Santiago, orient. II. Título

CDD 22.ed. – 572.8

Nome: PEDROSO, Daniela De Lucena
Título: Enzimas Oxidorredutases do fungo *Pestalotiopsis* sp.

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Área de Concentração:
Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovado em: 08/07/2020

Banca Examinadora

Profª. Drª. Sirlene Maria da Costa Instituição: EACH - USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas Instituição: IQ - USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª. Drª. Andrezza Justino Gozzo Andreotti Instituição: UNIFESP - Externo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Gostaria, primeiramente, de agradecer a meus maiores apoiadores e mais compreensivos suportes, meus pais, Ariovaldo Pedroso e Maria Dilzete de Lucena, que estiveram sempre ao meu lado durante todos os desafios e decisões que precisei tomar no decorrer da minha vida, sendo sinceros, fortes e reconfortantes. A eles agradeço por tudo que me ofereceram e pela confiança e liberdade que me proporcionaram quando fiz minhas escolhas, além de pela vida e ensinamentos que ajudaram a construir a pessoa que sou hoje.

À minha família que sempre mostrou interesse e desejo de ver meu crescimento e mesmo com a distância estando presentes e demonstrando todo amor e carinho ao ver meu caminhar em busca de novos desafios, agradecendo principalmente aos meus tios e primos que sempre mostraram que família não precisa estar perto, não precisa se falar todo o dia, não precisa de demonstrações de afeto exageradas para ser importante.

Aos meus amigos que estão comigo desde a época do fundamental. À Aline Favaro, Mayara Amorim e Manuela Camargo que viveram alguns dos momentos mais marcantes e estiveram comigo através da distância, tempo e das nossas personalidades diferentes. À Ana Carolina Lima (Chique, Nana), Beatriz Vital (BDB), Vinícius Silva (Pinguim doce-de-leite) e Roger Lucas (Rogeritos) que fizeram de Natal uma casa para mim nos anos de ensino médio e continuam sendo uns dos melhores amigos que a vida poderia ter me dado. Amigos que foram marcantes e me estiveram presentes nas escolhas que fiz para chegar aqui, além de acompanhar e me fazer sorrir nos anos mais marcantes da minha adolescência.

Agradeço também aos amigos que fiz graças aos quatro anos da graduação em ciências biológicas na UFRN, que compartilharam dos dias no CB, das viagens de campo, trabalhos em grupo, idas a C&T e muitas outras experiências inesquecíveis. À Jorge, Michel, Luis Felipe, Júnior, Kelly, Pedro Doce, Ril, e Bia pela amizade e, principalmente a Bárbara Floripes, Camila Cardoso e Ingrid Junkes as irmãs que a biologia me deu e que agradeço todos os dias pelos conselhos, brincadeiras e parceria, vocês todos são os presentes mais valiosos que a graduação me deu. Sou grata ao LQFPB pelos ensinamentos na iniciação cientifica e a todos os participantes desse grupo que me ensinaram muito nos meus dois anos de IC.

À Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP e ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela infraestrutura e suporte. Aos companheiros de laboratório Vittoria, Bruna, Gustavo, Jeniffer, Myrian, Nathalia, Izabela, Danielle, Malu, Fábio, Geison e Nina pelos momentos e experiências vividas, aos membros do grupo de pesquisa Adriana (e o Matteo), Suelen, Patrícia, Gabriel, Fábio, Amanda, Ana Paula, Thiago e Flavio por todo suporte e trocas de experiências durante esses dois anos. Também agradeço aos meus amigos da turma de mestrado Aline, Rafaela, Lodair, Rafael e William que estiveram juntos e compartilharam as dificuldades e anedotas que essa jornada proporcionou. Agradeço também aos funcionários e técnicos da EACH, em especial ao Clarino que foi indispensável para organização e manutenção do laboratório e por seus conselhos tão sábios.

À todos os professores que fizeram parte da construção do meio ensino, tanto na graduação como na pós-graduação, os agradeço por todos os ensinamentos e disponibilidade.

Ao meu orientador, professor Felipe Chambergo que me acolheu, dando a oportunidade para a realização desse trabalho, sou grata por seus ensinamentos, paciência e disponibilidade durante esses anos, além do suporte e compreensão dados nos momentos de dificuldades.

E, por fim, agradeço à Agência de Fomento à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro no desenvolvimento do processo n° 2017/25599-3, assim como a Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular pela criação e implementação nacional de programa de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

“Sabemos o que somos, mas não sabemos o que poderemos ser”

William Shakespeare

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”

Carl Sagan

RESUMO

PEDROSO, Daniela De Lucena. **Enzimas Oxidorredutases do Fungo *Pestalotiopsis* sp.** 2020. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A demanda por fontes renováveis de energia tem incentivado a pesquisa sobre a utilização da biomassa lignocelulósica como matéria prima para a produção de bioetanol 2G, tornando, assim, interessante o estudo e identificação das enzimas envolvidas na sua degradação. A presente dissertação tem como objetivo identificar a cepa BBF-245, produzir, purificar e caracterizar enzimas oxidorredutases – principalmente lacases – do fungo *Pestalotiopsis* sp. (BBF-245) a fim de avaliar a potencial utilização dessas proteínas na degradação do bagaço da cana-de-açúcar e em outras aplicações biotecnológicas. Durante o estudo foi realizada a identificação da cepa BBF-245 (como *Pestalotiopsis* sp) e a análise da produção de oxidorredutases pelo fungo no cultivo em meio MBC com 1% de bagaço da cana-deaçúcar, encontrando-se uma maior produção de enzimas lacases (2.006,7 U/mg) do que manganês peroxidases (16,42 U/mg) e lignina peroxidases (106,25 U/mg); esses resultados levaram à escolha das lacases para a continuação das seguintes etapas do trabalho. O sobrenadante do 4° dia em MBC com 1% de bagaço da cana-de-açúcar foi clarificado e concentrado para purificação em cromatografia de troca iônica, na qual foram obtidas duas lacases (PspLac1 e PspLac2) na eluição a 25mM e 50mM de NaCl, respectivamente. As duas enzimas foram, então, caracterizadas quanto à massa molecular aproximada (PspLac1 = 66,7 kDa e PspLac2 = 56,3 kDa), pH ótimo (PspLac1 = 3 e PspLac2 = 4), estabilidade térmica (20-60°C, ambas), Km (PspLac1 = 15,72mM e PspLac2 = 6,42mM), kcat (PspLac1 = $18x10^2$ s^{-1} e PspLac2 = $5x10^2$ s^{-1}) e kcat.Km^{-1} (PspLac1 = $1,14x10^2$ $s^{-1}.mM^{-1}$ e PspLac2 = $7,7x10$ $s^{-1}.mM^{-1}$). O presente trabalho permitiu a identificação do BBF-245 como *Pestalotiopsis* sp. e a caracterização de duas lacases nativas (PspLac1 e PspLac2), as quais podem ser utilizadas em várias aplicações biotecnológicas, como na composição de coquetéis enzimáticos para a degradação de biomassa.

Palavras-chave: Lignocelulose. Fungos. *Pestalotiopsis*. Oxidorredutases e Lacases.

ABSTRACT

PEDROSO, Daniela De Lucena. **Oxidoreductases Enzymes of the Fungus *Pestalotiopsis* sp.** 2020. 106p. Dissertation (Master of Science) – Postgraduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

The demand for renewable energy sources has encouraged research on the use of lignocellulosic biomass as a raw material for the production of 2G bioethanol, thus making it interesting to study and identify the enzymes involved in its degradation. This dissertation aims to identify the BBF-245 strain, produce, purify and characterize oxidoreductase enzymes - mainly laccases - from the fungus *Pestalotiopsis* sp. (BBF245) in order to evaluate the potential use of these proteins in the degradation of sugarcane bagasse and in other biotechnological applications. During the study, the identification of the strain BBF-245 (as *Pestalotiopsis* sp.) was carried out and the analysis of the production of oxidoreductases by the fungus in the culture in MBC medium with 1% of sugarcane bagasse, finding a greater production of laccase enzymes (2.006.7 U / mg) than manganese peroxidases (16.42 U / mg) and lignin peroxidases (106.25 U / mg), these results led to the choice of laccases for the continuation of the following stages of the work. The 4th day supernatant in MBC with 1% sugarcane bagasse was clarified and concentrated for purification in ion exchange chromatography, in which two laccases (PspLac1 and PspLac2) were obtained in the elution at 25mM and 50mM NaCl, respectively. The two enzymes were then characterized in terms of approximate molecular mass (PspLac1 = 66.7 kDa and PspLac2 = 56.3 kDa), optimum pH (PspLac1 = 3 and PspLac2 = 4), thermal stability (20-60 ° C, both), Km (PspLac1 = 15.72mM and PspLac2 = 6.42mM), kcat (PspLac1 = $18x10^2$ s^1 and PspLac2 = $5x10^2$ s^{-1}) and kcat.Km^{-1} (PspLac1 = $1.14x10^2$ s^{-1}.mM^{-1} and PspLac2 = 7.7x10 s^{-1}.mM^{-1}). The present work allowed the identification of BBF-245 as *Pestalotiopsis* sp. and the characterization of two native laccases (PspLac1 and PspLac2), which can be used in various biotechnological applications, such as in the composition of enzymatic cocktails for the degradation of biomass.

Keywords: Lignocellulose. Fungi. *Pestalotiopsis*. Oxidorreductases and Laccases.

Lista de abreviaturas

1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
ABTS	2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
BSA	Albumina Sérica Bovina
BBF	Biblioteca de Fungos do laboratório de Biotecnologia da EACH
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CBP	Bioprocesso consolidado
CF	Co-fermentação
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetil amônio
CYA	Czapek Yeast Extract Agar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Àcido 3,5- dinitrosalicílico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
$FeSO_4$	Sulfato de ferro
INPI	Intituto Nacional de Propriedade Intelectual
ITS	Região espaçadora interna transcrita
Lac	Lacases
LiP	Lignina peroxidases
LSU	*Large subunit* RNA
MBC	Meio Bagaço da Cana-de-açúcar
MEA	Malt Extract Agar
MnP	Manganês peroxidases
$MnSO_4$	Sulfato de manganês
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
PBA	Tampão acetato borato fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth

PspLac	Lacase de *Pestalotiopsis* sp.
RNA	Ácido desoxirribonucleico
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSCF	Sacarificação simultânea e co-fermentação
SSF	Sacarificação simultânea e fermentação
SSU	*Small subunit* RNA
TEMED	Tetrametil etilenodiamina
Tris-HCl	Cloridato de hidroximetil aminometano
USPTO	*United States Patent and Trademark Office*
$ZnSO_4$	Sulfato de zinco

Lista de Figuras

Figura 1: Configuração estrutural da parede celular vegetal.....19
Figura 2: Representação da estrutura química da lignina.....20
Figura 3: Representação da estrutura química da celulose.....21
Figura 4: Representação da estrutura química do heteropolissacarídeo hemicelulose.....22
Figura 5: Esquema de degradação da lignocelulose**.** 23
Figura 6: Enzimas envolvidas na degradação da porção celulósica. 24
Figura 7: Enzimas envolvidas na degradação de lignina.....25
Figura 8: Mecanismo proposto do modelo de redução e reoxidação, na presença de oxigênio atmosférico, dos sítios de cobre das lacases. 27
Figura 9: Oxidação de subunidades fenólicas por lacases. 28
Figura 10: Modelo esquemático do ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase.....31
Figura 11: Modelo esquemático do ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase a partir de um substrato não fenólico (S) e intermediários oxidados.....32
Figura 12: Esquema de localização dos oligonucleotídeos no rDNA fúngico: SSU (Small subunitRNA) 18S, LSU (Large subunitRNA) 25-28S.....40
Figura 13: Esquema das etapas de crescimento em meio líquido da cepa BBF-245 (*Pestalotiopsis* sp.) para a produção de oxidorredutases. 42
Figura 14: Conversão do ABTS a ABTS+ por ação da atividade de lacases.....44
Figura 15: Conversão do veratril álcool a veratrilaldeído por ação da atividade de Lignina peroxidases.....44
Figura 16: Conversão do guaiacol a 3,3′-dimethoxi-bifenol-4,4′-quinona (tetraquinona) por ação da atividade de manganês peroxidases. 45
Figura 17: Placas de cultivo da cepa BBF-245.....51
Figura 18: Microcultivo do BBF-245.....52
Figura 19: Comparativo de morfologia e conídios de *Pestalotiopsis*.....53
Figura 20: Sintomas de fitopatologias atribuídas ao gênero *Pestalotiopsis*.....57
Figura 21: Atividade (U/mg) de lacases quantificada do sobrenadante da cultura de *Pestalotiopsis* sp. em meio MBC com 1% de bagaço da cana-de-açúcar estéril durante dez dias de cultivo em agitação e temperatura constantes. 60
Figura 22: Atividade (U/mg) de manganês peroxidases, e lignina peroxidases quantificadas do sobrenadante da cultura de *Pestalotiopsis* sp. em meio MBC com 1% de bagaço da cana-de-açúcar estéril durante dez dias de cultivo em agitação e temperatura constantes.....62
Figura 23: Cromatograma da purificação feita em resina de troca iônica catiônica Q-

Sepharose (10mL).....65
Figura 24: Zimograma para detecção de lacases (ABTS 2mM). 66
Figura 25: Eletroforese e zimograma com PspLac1 (aproximadamente 66,7 kDa), fração 25%, PspLac2 (aproximadamente 56,3 kDa) e fração 50% corada em solução de nitrato de prata e ABTS 2mM.....67
Figura 26: Curva de pH ótimo da enzima PspLac1 considerando a variação de pH de 3-12 de PBA 20mM.....69
Figura 27: Curva de pH ótimo da enzima PspLac2 considerando a variação de pH de 3-12 de PBA 20mM.....70
Figura 28: Curva de estabilidade térmica da enzima PspLac1 considerando o percentual da atividade remascente da enzima.....72
Figura 29: Curva de estabilidade térmica da enzima PspLac2 considerando o percentual da atividade remascente da enzima.....73
Figura 30: Atividade da PspLac1 em concentrações crescentes de substrato (ABTS) apresentando um perfil de curva hiperbólica caracteristicos de enzimas michaelinas.....76
Figura 31: Atividade da PspLac2 em concentrações crescentes de substrato (ABTS) apresentando um perfil de curva hiperbólica característicos de enzimas michaelinas.....77

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos usados na identificação do fungo BBF-245…….**.....39**
Tabela 2: Classificação taxonômica do BBF-245 55
Tabela 3: Análise comparativa da sequência de rDNA do fungo BBF-245 com outros organismos presentes no NCBI 56
Tabela 4: Dados de pH e temperatura de lacases fúngicas 74
Tabela 5: Caracterização de enzimas lacases de diferentes organismos……....79
Tabela 6: Caracterização das lacases de *Pestalotiopsis* sp. (BBF-245).....81

SUMÁRIO

Agradecimentos.....3
RESUMO.....6
ABSTRACT.....7
Lista de abreviaturas.....8
Lista de figuras.....10
Lista de tabelas.....12
1. INTRODUÇÃO.....15
1.1 Bioetanol a partir da cana-de-açúcar.....16
1.2 Lignocelulose.....18
1.2.1 Estrutura da parede celular vegetal.....18
1.2.2 Enzimas lignocelulolíticas e a degradação da lignocelulose.....22
1.2.2.1 Lacases (EC 1.10.3.2).....25
1.2.2.2 Manganês peroxidases (EC 1.11.1.13).....30
1.2.2.3 Lignina Peroxidases (EC 1.11.1.14) 31
1.3 Degradação de biomassa por microrganismos.....32
1.4 Enzimas Oxidorredutases de fungos 33
2. OBJETIVOS.....36
2.1 Objetivo geral.....36
2.2 Objetivos específicos 36
3. METÓDOS.....37
3.1 Identificação taxonômica e molecular do fungo BBF-245.....37
3.1.1Identificação morfológica.....37
3.1.2Identificação molecular.....38
3.2 Cepas e condições de cultivo 41
3.3 Crescimento de *Pestalotiopsis* sp. em meio com bagaço da cana-de-açúcar.....41
3.4 Determinação da atividade de enzimas oxidorredutases.....42
3.4.1 Lacase 43
3.4.2 Lignina Peroxidase 44
3.4.3 Manganês Peroxidase.....45
3.4.4Cinética-enzimática.....45
3.5 Concentração de proteínas.....46
3.6 Purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica.....46
3.7 Zimograma.....47
3.8 Eletroforese em Gel de poliacrilamida.....47
3.9 Quantificação de proteínas totais.....48
3.10 Avaliação do efeito do pH e temperatura nas lacases isoladas.....49
4. RESULTADOS E DISCUSSÂO.....50
4.1 Identificação da cepa BBF-245.....50
4.2 Atividade de oxidorredutases pelo fungo *Pestalotiopsis* sp. 58
4.4 Isolamento de lacases nativas do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp....63
4.4 Caracterização das lacases PspLac1 e PspLac2.....67
5. CONCLUSÃO.....80

6.PERSPECTIVAS.....82
7.REFERÊNCIAS.....83
Anexos.....98
Anexo I.....98
Anexo II.....99
Anexo III.....100
Anexo IV.....102
Anexo V.....104
Anexo VI.....105
Anexo VII.....106

1. INTRODUÇÃO

Para que as mudanças climáticas possam ser freadas é necessário realizar a transição dos sistemas energéticos clássicos, que levam a grandes emissões de poluentes atmosféricos e são diretamente ligados aos problemas ambientais atuais, para os sistemas energéticos limpos e renováveis. Tais fontes energéticas, além de permitirem a diminuição da liberação dos gases do "efeito estufa", também garantem uma maior segurança quanto à disponibilidade e prevalência nos anos que estão por vir, sem a existência de um risco iminente de esgotamento, uma vez que os derivados fósseis já estão próximos da sua depleção (SCHMIDT et al., 2019). Ademais, essas fontes alavancam o aumento do desenvolvimento econômico nacional, diminuindo a necessidade de importação dos combustíveis convencionais (OLIVEIRA, 2011).

Em 2014, apenas 39% da demanda primária de energia no Brasil era derivada de fontes renováveis, com 60,6% proveniente de biomassa (biocombustíveis sólidos, líquidos e gasosos), 29,2% de energia hidrelétrica e 10,2% de energia solar, eólica e outras fontes (DE ARAGÃO PEDROSO et al., 2018). O uso da biomassa, principalmente como matriz energética, possui importantes vantagens socioambientais e econômicas por ser sustentável, com baixa liberação de poluentes atmosféricos; possibilitar a ciclagem dos subprodutos sólidos da agroindústria, como palha (milho) e bagaço (cana-de-açúcar); auxiliar na geração de empregos e na redução do êxodo rural; incentivar o mercado interno para a expansão do comércio internacional pela venda do excedente da produção; e ampliar as opções de apoios energéticos renováveis no país (DE MIRANDA et al., 2019). No Brasil, a cana-de-açúcar é uma importante cultura para a produção de bioenergia, podendo ser utilizada em diferentes segmentos, como no caso da produção de bioetanol e do eventual uso na fabricação de bioetanol de segunda geração.

O uso de combustíveis renováveis é uma alternativa para a substituição dos combustíveis fósseis (GOLDEMBERG, 2006), uma vez que o bioetanol e o biodiesel possuem uma menor emissão de poluentes e, consequentemente, causam menor impacto ambiental quando comparados ao uso do petróleo e de seus derivados. Isso ocorre devido ao fato de esses combustíveis serem obtidos a partir de óleos vegetais e carboidratos (GOLDEMBERG, 2007), matérias primas em constante reposição e que

estão inseridas na ciclagem do carbono, oposto daquilo que ocorre em relação aos compostos fósseis, em que não é passível a reposição.

1.1 Bioetanol a partir da cana-de-açúcar

Nos anos de 1990, os combustíveis de origem fóssil foram responsáveis por 65% do total de gases do efeito estufa liberados na atmosfera (COVERT et al., 2016), fato que provocou a criação e implementação mundial de medidas para a mudança da fonte de abastecimento dos veículos de transporte. No Brasil, houve a implementação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) como uma medida mitigadora, incentivando-se o uso do etanol combustível, o que levou a um aumento na sua produção de, aproximadamente, 14 bilhões de litros por ano (1979-1999) (GELLER et al., 2004). A partir de 2000, o uso do bioetanol já tinha se tornado uma tendência mundial, acompanhando as necessidades de mudanças para frear os impactos ambientais e políticos que os derivados do petróleo provocavam no mundo (ROSA e GARCIA, 2009), sendo esperado que até 2025 a indústria do bioetanol esteja consolidada mundialmente (ALISSON, 2017). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor e exportador (1,5 Mt) (PROSKURINA et al., 2019) de bioetanol (ALISSON, 2017; HUGO, 2018; MARQUES, 2018; DE SOUZA et al., 2013; KURIAN et al., 2013), consistindo a cana-de-açúcar na principal matéria prima na produção desse combustível no país, com expectativa de que a safra dessa cultura chegue a 622,3 milhões de toneladas em 2019/2020 (http://www.conab.gov.br/).

A moagem da cana-de-açúcar gera o caldo de cana para a produção de açúcar, bioetanol ou etanol (1G); e seu bagaço, resíduo agrícola mais abundante do país, pode ser utilizado na produção de bioetanol de segunda geração (2G), na geração de energia elétrica e na obtenção de outros coprodutos economicamente importantes, como farneseno e polietileno (DE SOUZA et al., 2013).

Sabe-se que a composição da biomassa vegetal determina sua recalcitrância, apresentando uma porção de celulose formada por polímeros de glicose (hexose) associados entre si; esta é, então, recoberta por polímeros de hemicelulose (pentoses e hexoses) e lignina (formando por moléculas aromáticas), formando a parede celular

que protege a célula vegetal contra ataques físicos, químicos e biológicos (CARVALHO et al., 2006). Assim, a obtenção dos açúcares presentes na biomassa é de interesse para a fabricação de diversos produtos através de fermentação, como é o caso do bioetanol 2G, produzido através da sacarificação do bagaço da cana-deaçúcar (DIAS et al., 2011).

Devido à característica estrutural rígida desse tecido, estão sendo desenvolvidos diversos processos de otimização da sacarificação para produção do bioetanol 2G, como: sacarificação simultânea e fermentação (SSF), co-fermentação (CF), sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF) e o bioprocesso consolidado (CBP) (SANCHEZ et al., 2005; CARDONA et al., 2007; WYMAN, 2007). Contudo, o custo desses processos é alto, uma vez que as enzimas necessárias na degradação da biomassa lignocelulósica são caras, equivalendo a, aproximadamente, 40% do valor de produção do bioetanol 2G (IMMANUEL et al., 2007; SINGHANIA et al., 2007).

As enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica são hoje estudadas com o intuito de aumentar a eficácia desse processo, de maneira que este seja economicamente mais viável. Inúmeras empresas trabalham no desenvolvimento de pesquisas para a redução do valor das enzimas necessárias para hidrólise da biomassa vegetal (*Dyadic Internationale Genecor* e *Verenium* nos Estados Unidos, *Novozymes* na Dinamarca e *logen Corporation* no Canadá) (CARDONA et al., 2007), sendo a busca pela criação de coquetéis enzimáticos a proposta que visa solucionar a dificuldade acerca da obtenção de açúcares fermentáveis solúveis para a produção de combustíveis renováveis, uma vez que atualmente são necessários vários passos e intercalações de processos físicos e químicos combinados para a aquisição desses açúcares.

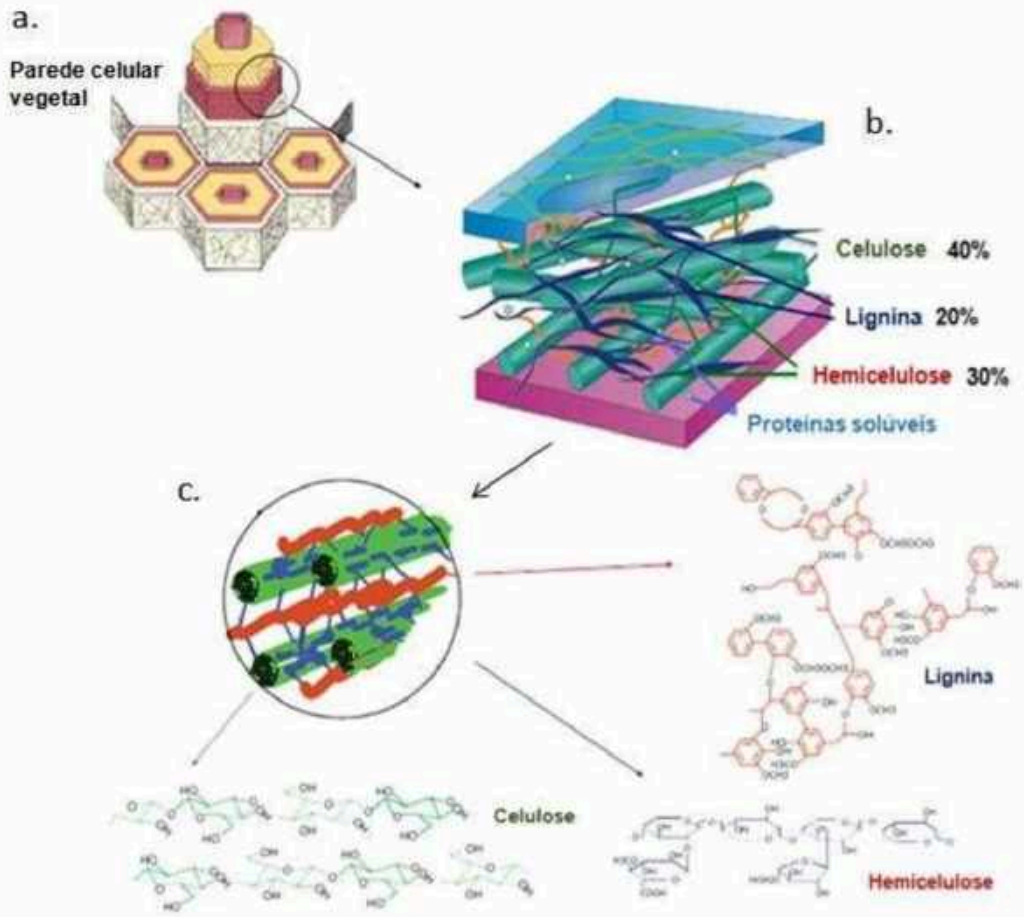
1.2 . Lignocelulose

1.2.1 Estrutura da parede celular vegetal

As plantas apresentam uma parede de lignocelulose que envolve a membrana plasmática celular (Figura 1). Essa estrutura é dividida em parede primária (i) e secundária (ii), em que: (i) é depositada rente à membrana e possui uma certa flexibilidade para permitir a expansão da célula durante o crescimento da planta, observando-se na sua composição a presença, principalmente, de celulose, hemicelulose e pectina; enquanto (ii), dado início o processo de diferenciação celular, é menos maleável, impermeável e responsável pela manutenção da estrutura espacial da planta, sendo composta, em sua maioria, por celulose, hemicelulose e lignina, com a primeira tendendo a ser o polímero mais abundante no tecido.

Existe uma grande variação do percentual de cada componente presente na parede celular entre as espécies vegetais, dado que as características desse tecido estão relacionadas à idade e ao habitat de cada planta (RAVEN et al., 2001); contudo, há um consenso quanto às moléculas que formam a lignocelulose. No caso do bagaço da cana-de-açúcar, sua composição é de, aproximadamente, 40% de celulose, 30% de hemicelulose e 20% de lignina, além de quantidades menores de lipídeos, proteínas solúveis e estruturais que encontram-se intimamente ligadas entre si na formação da parede celular vegetal (DE SOUZA et al., 2013; SZCZERBOWSKI et al., 2014). Essas características, em conjunto com a composição do tecido, estão associadas ao papel de proteção e sustentação desempenhado pela parede celular, uma vez que as interações entre essas moléculas tornam as plantas mais resistentes à ação de agentes tanto bióticos quanto abióticos (HERNANDEZ-ORTEGA et al., 2012).

Figura 1: Configuração estrutural da parede celular vegetal.

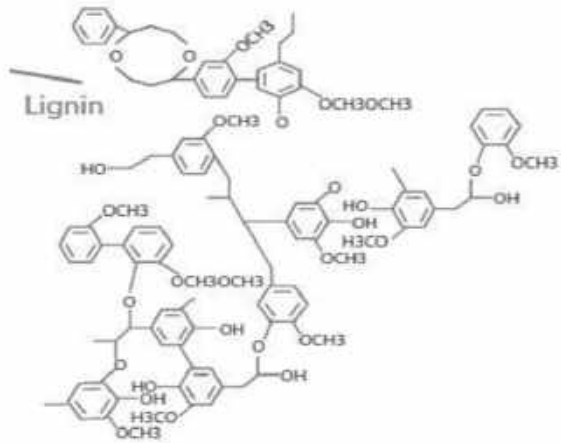


(**a.**) Parede celular vegetal: Amarelo representando a parede primária e Vermelho a parede secundária (em destaque na imagem); (**b.**) Ampliação da estrutura em destaque em **a**, juntamente com o percentual aproximado de cada polímero na construção da estrutura (40% de celulose, 20% de lignina e 30% de hemicelulose); (**c.**) Maneira que estão dispostos os polímeros e suas estruturas (Adaptado de ANWAR et al., 2014, STICKLEN, 2008).

A lignocelulose, componente da parede vegetal, é um polímero de alta complexidade, constituído pela união de lignina (heteropolímero de compostos aromáticos) (Figura 2), celulose (homopolissacarídeo linear de glicose) (Figura 3) e hemicelulose (heteropolissacarídeo constituído por diversos açúcares, dentre hexoses e pentoses) (Figura 4); além de outras moléculas em menor expressividade, como proteínas e pectinas (SANDGREN et al., 2005; POLIZELI et al., 2005). A despolimerização desse tipo de biomassa gera a obtenção de açúcares fermentáveis,

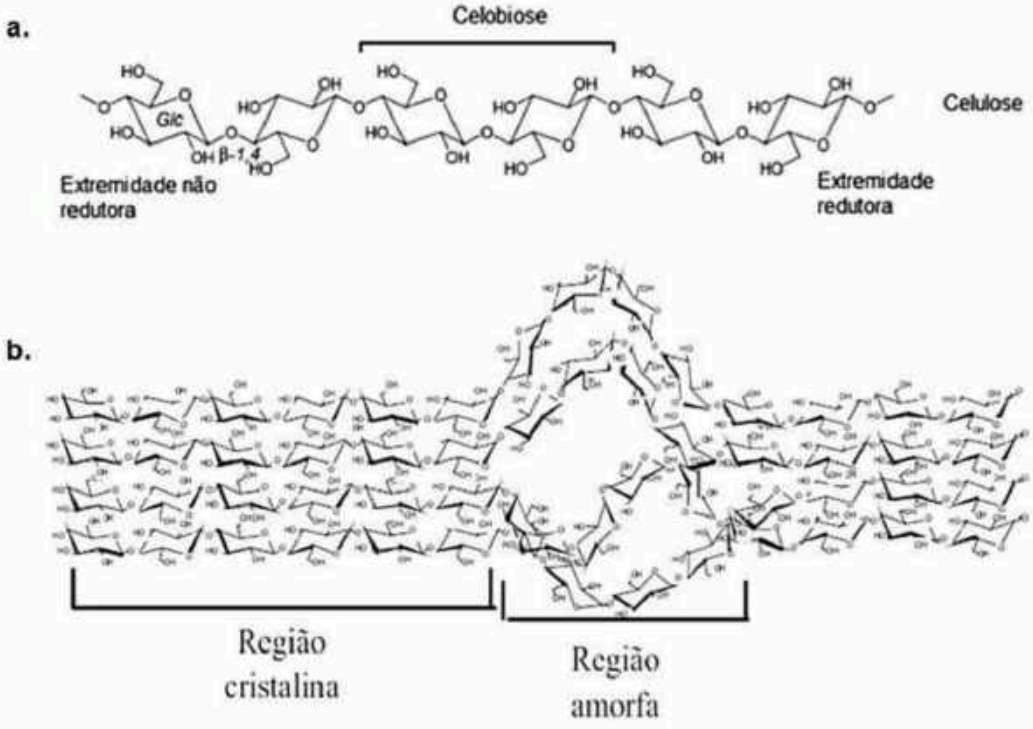
sendo esses interessantes para a produção de energia renovável, como é o caso dos biocombustíveis derivados da biomassa vegetal (SETHI et al., 2013).

Figura 2: Representação da estrutura química da lignina.



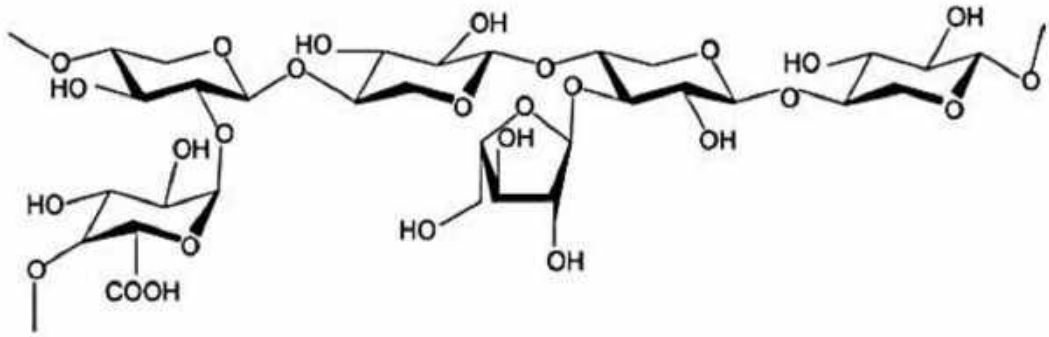
(Adaptado de ZHANG, 2008).

Figura 3: Representação da estrutura química da celulose.



(**a.**) Estrutura linear da celulose, formada pelas ligações glicosídicas β-(1→4) entre as moléculas de glicose, destacando-se a celobiose (dimero de glicose) e as extremidades redutora e não redutora (Adaptado de SANDGREN et al., 2005); (**b.**) Homopolissacarídeo de glicose, com destaque para as regiões cristalina e amorfa (Adaptado de SUN; CHENG, 2002).

Figura 4: Representação da estrutura química do heteropolissacarídeo hemicelulose.



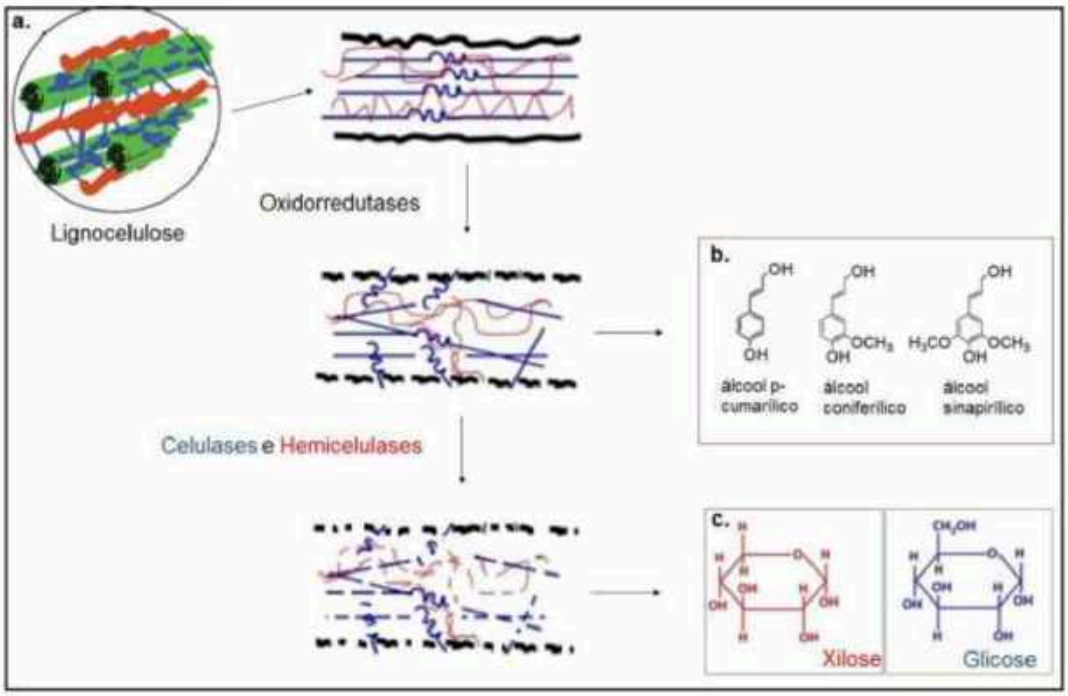
(ZVIELY, 2013).

1.2.2 Enzimas lignocelulolíticas e a degradação da lignocelulose

Para ocorrer a degradação da biomassa lignocelulósica é necessário que seja superada a recalcitrância desse tecido através de estratégias de separação dos componentes e hidrólise das estruturas moleculares que o formam (FERREIRA et al., 2018), sendo as classes de enzimas envolvidas nesse processo as oxidorredutases (clivando a porção de lignina) e as hidrolases (celulases e hemicelulases, que clivam os polímeros celulose e hemicelulose, respectivamente) (GARCIA et al., 2018; MARTINEZ et al., 2017; SHARMA et al., 2016; BHATTACHARYA et al., 2015).

A partir dessas informações foi estabelecido um sistema enzimático constituído por enzimas celulolíticas, responsáveis pela degradação dos polímeros de celulose e hemicelulose; e por enzimas acessórias, responsáveis pela catálise da despolimerização da lignina propriamente dita através de reações de oxidorredução que levam à quebra das ligações carbono-carbono e éter das moléculas que a compõem, realizada principalmente por oxidorredutases e polissacarídeo monoxigenases (PMO) (Figura 5) (LEVASSEUR et al., 2013).

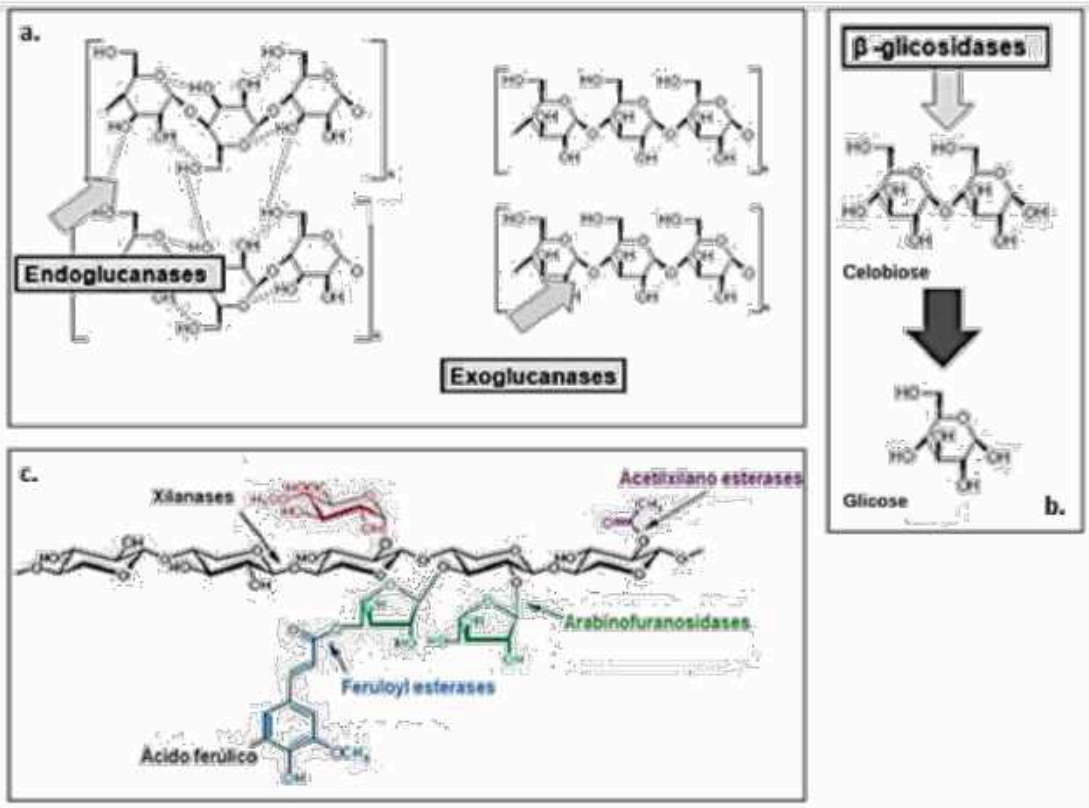
Figura 5: Esquema de degradação da lignocelulose.



(**a.**) Representação da estrutura da lignocelulose e sequência de ação das enzimas envolvidas com a sua degradação (oxidorredutases atuando sobre a lignina; e celulases e hemicelulases atuando, respectivamente, sobre a celulose e hemicelulose). (**b.**) Esquema estrutural de componentes da lignina. (**c.**) Esquema estrutural dos açúcares xilose e glicose. (Adaptado de ANWAR et al., 2014).

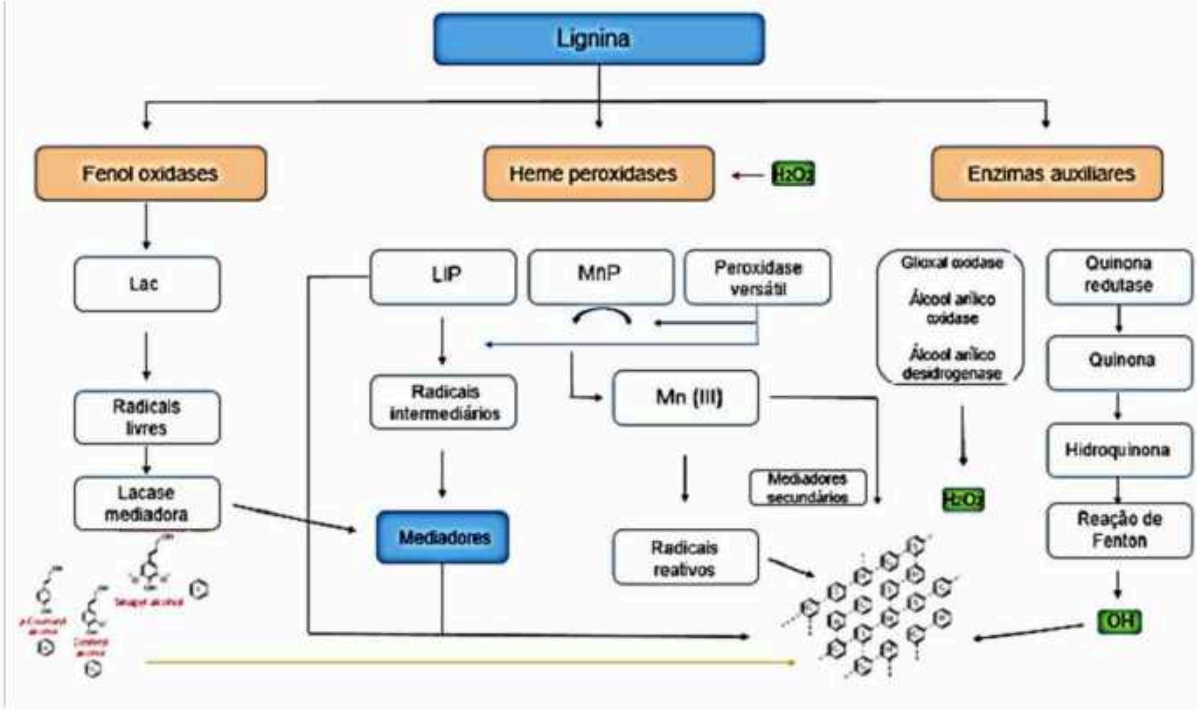
Assim, para a degradação da celulose e hemicelulose são necessárias enzimas hidrolíticas, como é o caso das exoglucanases (EC 3.2.1.74), endoglucanases (EC 3.2.1.37), β-glicosidases (EC 3.2.1.21), xilanases (EC 3.2.1) (xilosidases, endoxilanases), acetil-xilano-esterases, esterases, arabinofuranosidases, entre outras enzimas que atuam na hidrólise de polímeros de carboidratos. Já na quebra da lignina, são necessárias enzimas que atuem em processos de oxidorredução (oxidorredutases), como as lacases (EC 1.10.3.2) e as peroxidases (EC 1.11.1) (lignina peroxidase e manganês peroxidase) (FERREIRA et al., 2018; KÜES, 2007) (Figura 6 e 7).

Figura 6: Enzimas envolvidas na degradação da porção celulósica (**a.** e **b.**) e hemicelulósica (**c.**) da lignocelulose.



(Adaptado de ANWAR et al., 2014).

Figura 7: Enzimas envolvidas na degradação de lignina.



(Adaptado de DASHTBAN et al, 2010).

1.2.2.1 Lacases (EC 1.10.3.2)

As lacases (Lac) (polifenoloxidases; benzenodiol: oxigênio oxidorredutase) são um grupo de enzimas que catalisam a oxidação de uma grande variedade de substratos (aminofenóis, metoxifenóis, aminas aromáticas, polifenóis e – na presença de alguns mediadores químicos – compostos aromáticos com alto potencial redox) utilizando o oxigênio atmosférico como aceptor de elétrons e formando água a partir dessa reação (AGUIAR e FERRAZ, 2011; MATE e ALCALDE, 2017; NUNES e KUNAMNENI, 2018). Esse conjunto de enzimas parte do grupo de oxidorredutases da família de Multicobre Oxidases (MCOs), de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), assim como as ceruloplasminas (proteína encontrada no plasma de mamíferos), oxidases de bilirrubina e oxidases ascórbicas, sendo as últimas particularmente semelhantes às lacases quanto sua estrutura primária (ALCALDE, 2007; NUNES e KUNAMNENI, 2018). Ademais, as lacases são

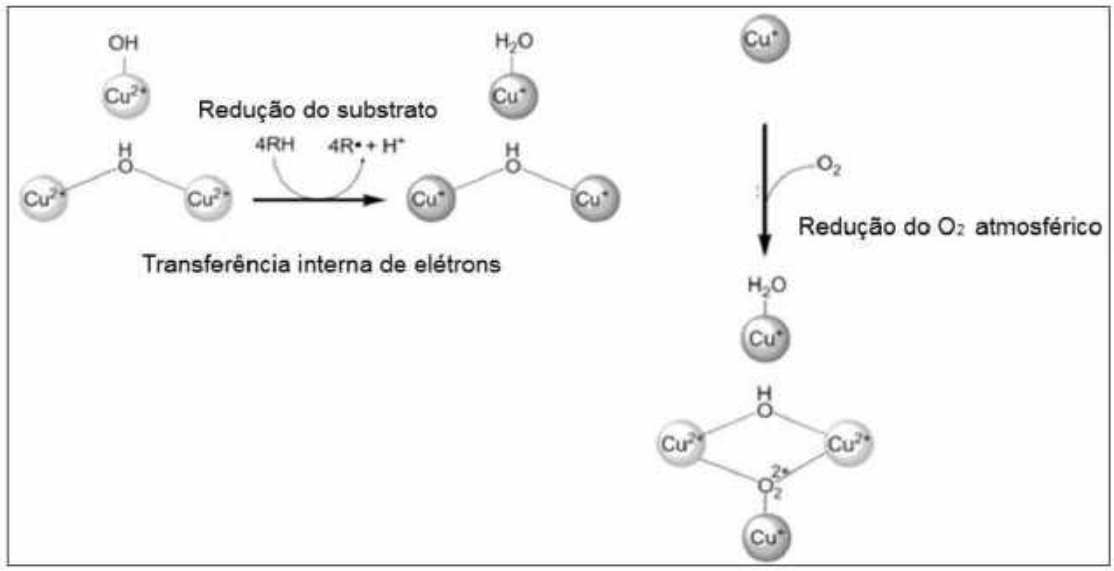
proteínas monoméricas ou com a formação de homodímeros, algumas vezes glicosiladas e, em sua maioria, com a massa molecular variando entre 60-100 kDa com 10-50% do peso podendo ser relativa ao padrão de glicosilação da enzima (MADHAVI e LELE, 2009).

Dentro desse grupo é característica, na maioria das lacases descritas, a presença de quatro átomos de cobre por monômero, que, por sua vez, são categorizados em três grupos (por espectroscopia de ressonância paramagnética): tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) e tipo 3 (T3), em que T2 e T3 formam um centro trinuclear no qual ocorre a redução do oxigênio a água, enquanto o T1 pode ser removido da enzima pela ação de alguns solventes, além de ser relativamente instável no conjunto estrutural da enzima (LEONTIEVSKY et al., 1997; MADHAVI e LELE, 2009). Contudo, o potencial redox do tipo 1 se faz importante em relação a como será o comportamento catalítico dessa proteína, uma vez que quanto maior o potencial de redução, maior será a capacidade oxidativa da enzima (RIVERA-HOYOS et al., 2013). Sua estequiometria é baseada pela presença de quatro moléculas de um substrato redutor para cada oxigênio molecular disponível na reação, com a transferência total de quatro elétrons [4RH + O_2; 4R + 2H 2O], na qual os quatro íons de Cu^{2+} associados à proteína são reduzidos pelos elétrons doados do substrato e, após oxidação desses sítios de cobre, os hidrogênios são recebidos pelo oxigênio formando água (AGUIAR e FERRAZ, 2011). Apesar de a maioria das enzimas desse grupo apresentar essas características típicas, existem algumas lacases purificadas que não se enquadram fielmente nesse modelo (como as lacases "amarelas") (MADHAVI e LELE, 2009) (Figura 8 e 9).

Essas enzimas são umas das mais antigas já descritas. O trabalho de Hikorokuro Yoshida em 1883 foi o primeiro a descrever enzimas com características hoje atribuídas ao grupo das lacases, quando identificou na laca (incrustação resinosa encontrada em algumas espécies de árvores) da *Rhus vernicifera* um "material peculiar" com capacidade de diástase na presença de oxigênio e água. Treze anos depois (1896) foi encontrada a primeira variante desse grupo em fungos (BALDRIAN, 2006; KUNAMNENI, 2008; NUNES e KUNAMNENI, 2018) e mais recentemente em bactérias e alguns insetos (BUSWELL et al. 1996; DITTMER et al. 2004; CLAUS, 2003; ROSCONI et al. 2005; POLLEGIONI et al. 2015); contudo, a maior parte das lacases

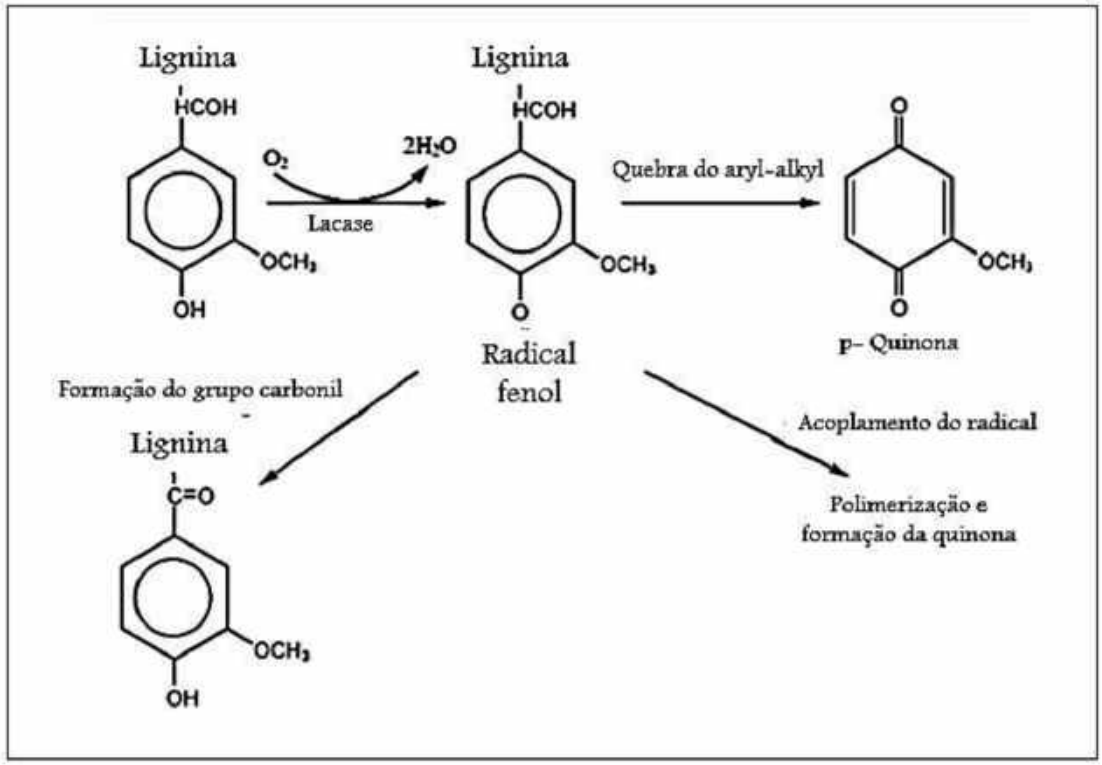
já descritas até hoje são de origem vegetal e fúngica (NUNES e KUNAMNENI, 2018). Estima-se que até 2018, cerca de 150 lacases haviam sido isoladas e caracterizadas (NUNES e KUNAMNENI, 2018), com mais de 60 dessas descritas a partir de fungos ascomicotas, basidiomicotas e deuteromicetos (ALCALDE, 2007), podendo ser citados como exemplos de gêneros que possuem lacases: *Trametes*, *Pleurotus*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, entre outros fungos filamentosos (KERSTEN, 1990; WANG et al., 2008; GASSARA et al., 2010; BILAL et al., 2017).

Figura 8: Mecanismo proposto do modelo de redução e reoxidação, na presença de oxigênio atmosférico, dos sítios de cobre das lacases.



(Adaptado de POLLEGIONI et al., 2015).

Figura 9: Oxidação de subunidades fenólicas por lacases.



Os passos do mecanismo de ação dessa classe de enzimas, segue: 1. Redução do substrato causado pela redução do T1; 2. Transferência interna de elétrons entre T1 para T2 e T3; 3. Redução do oxigênio atmosférico a água em T2 e T3 (Adaptado de MADHAVI e LELE, 2009).

Em pesquisa realizada em 28 de fevereiro de 2020, na base de dados eletrônica de patentes do Intituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) e do *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), observou-se que estão registrados, respectivamente, 19 e 52 pedidos de patentes com lacases, encontrando-se desde patentes para a caracterização de novas enzimas até pedidos de patentes para a aplicação da Lac em processos biotecnológicos. Esses números apresentam-se como um reflexo do fato de as lacases serem consideradas proteínas "*eco-friendly*" (RIVA, 2006), conhecidas como biocatalizadoras de vários substratos e com apenas água como sub-produto, de modo que são associandas diretamente à química-verde (RAMOS et al., 2011; FOROOTANFAR e FARAMARZI, 2015), circunstância que as torna atrativas no desempenho de bioprocessos.

Essas enzimas estão biologicamente envolvidas na liberação de radicais livres para a produção de lignina, polimerização de flavonóides em sementes, proteção contra compostos tóxicos em hifas fungos fitopatogênicos, na virulência, morfogênese, desenvolvimento e síntese de melanina de alguns fungos, pigmentação, resistência a UV e cobre, esclerotização e maturação da cutícula de alguns insetos e outras funções indispensáveis para a sobrevivência de muitos organismos (FOROOTANFAR e FARAMARZI, 2015; NUNES e KUNAMNENI, 2018); assim como são industrialmente utilizadas na descoloração têxtil, degradação de lignina e xenobióticos, limpeza de efluentes, biorremediação, na indústia alimentícia, na síntese de produtos orgânicos e em outras variadas aplicações (COUTO e HERRERA, 2006; RIVERA-HOYOS et al., 2013; ARORA e SHARMA, 2010; MADHAVI e LELE, 2009; SUBRAMANIAN et al., 2014).

Em suma, as lacases são proteínas que continuam sendo, mesmo depois de anos de sua descorberta, uma das enzimas mais atrativas do ponto de vista biotecnológico, podendo desempenhar um importante papel na substituição dos processos ecologicamente danosos, na despoluição e na implementação de alternativas renovavéis.

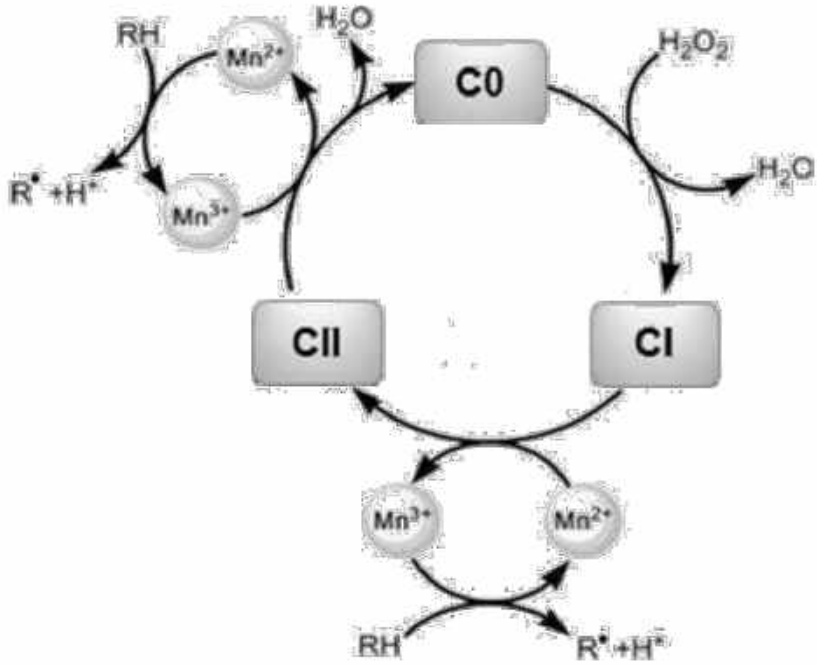
1.2.2.2 Manganês peroxidases (EC 1.11.1.13)

As manganês peroxidases (MnP) são heme-glicoproteínas oxidorredutases de peróxido de hidrogênio dependentes do íon manganês (Mn^{2+}) (LUEANGJAROENKIT et al., 2019), foram descobertas em 1984 por Kurawara e colaboradores, e são consideradas uma modificação de peroxidases de lignina comumente produzidas pelo metabolismo secundário de alguns fungos basidiomicetos (PATRICK et al., 2011; JANUSZ, 2013).

Esse grupo de enzimas atua na oxidação de manganês altamente reativos que podem levar a despolimerização da lignina e de outros compostos recalcitrantes, na formação de complexos com alguns ácidos como ácido malônico, oxálico e dicarboxílico, além de agir na oxidação subsequente de compostos fenólicos e não fenólicos pelo Mn^{3+} que será reduzido na reação a Mn^{2+} (FALADE et al., 2017; LUEANGJAROENKIT et al., 2019).

A MnP tem um perfil catalítico (Figura 10) que se assemelha ao observado em outras peroxidases, como as lignina peroxidases; entretanto, ela precisa de um íon manganês que possa ser oxidado para a conversão dos oxocomplexos I (CI) e II (CII), sendo o Mn^{2+} indispensável para a que o CII possa ser transformado a C0. Como acontece com a LiP, o peróxido de hidrogênio serve como agente redutor sobre o C0 formando CI, o qual pode ser convertido a CII pela oxidação de manganês ou de um substrato fenólico e, por fim, CII é reduzido ao iniciador da reação C0 (AGUIAR e FERRAZ, 2011; POLLEGIONI et al., 2015).

Figura 10: Modelo esquemático do ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase.



(Adaptado de POLLEGIONI et al, 2015).

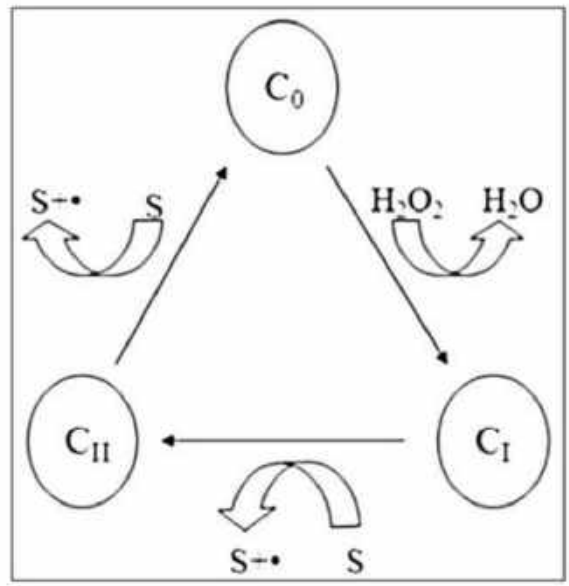
1.2.2.3 Lignina Peroxidases (EC 1.11.1.14)

A lignina peroxidase (LiP) é uma heme-glicoproteína com função de biodegradação dos resíduos de lignina da parede celular vegetal, desempenhando esse papel através da catálise da oxidação de estruturas fenólicas e não fenólicas dentro do polímero de lignina (DASHTBAN, 2010).

Essas enzimas possuem um alto potencial redox e estão ativas em uma faixa de pH ácida, características que estão relacionadas à capacidade de essas proteínas oxidarem diferentes substratos poliméricos, como corantes e tecidos vegetais. Durante a catalise promovida na presença de LiP existe a formação de radicais catiônicos pela oxidação de um elétron que, por consequência, leva a processos de rearranjos intramoleculares, desmetilação e clivagem de cadeias laterais (FALADE et al., 2017).

A LiP atua em uma reação de três etapas (Figura 11), iniciando-se pela retirada de um hidrogênio do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formação de um oxocomplexo deficiente de dois elétrons (CI). O CI é então reduzido pela oxidação de um substrato, que pode ser tanto fenólico como não fenólico, a um novo complexo CII susceptível a aceitar outro elétron e, portanto, ser reduzido ao C0, o qual estará disponível a nova ativação de LiP quando existir peróxido de hidrogênio reativo (AGUIAR e FERRAZ, 2011).

Figura 11: Modelo esquemático do ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase a partir de um substrato não fenólico (S) e intermediários oxidados.



(Adaptado de AGUIAR e FERRAZ, 2011).

1.3 Degradação de biomassa por microrganismos

Os fungos filamentosos e as bactérias são organismos com alta dispersão de nichos e desempenham variadas funções dentro dos ecossistemas que habitam (VAZ, 2012; SACCO, 2013; SANTOS, 2016), destacando-se, dentre elas, a capacidade de degradar biomassa vegetal (BHATTACHARYA et al., 2015). Essa característica foi responsável por impulsionar o estudo de fungos e bactérias como potenciais

produtores de enzimas lignocelulolíticas (BHATTACHARYA et al., 2015; RUHL e KUES, 2007).

Sabe-se que diversos fungos e bactérias são produtores de enzimas lignocelulolíticas (MAEDA et al., 2011; VALENCIA e CHAMBERGO, 2011), como é o caso dos fungos *Trametes versicolor*, *Trametes vilosa*, *Phanerochaete chryssosporium*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, e das bactérias *Actinomyces* sp. (KIM *et al.*, 2016), *Paenibacellus* sp. (DHAR et al., 2015), *Pseudoalteromonas* sp. (NAKATANI et al., 2010), *Thermobacillus xylanilyticus* (RAKOTOARIVONINA et al., 2016), *Pseudonocardia* sp. (DU et al., 2014), entre outros que podem ser considerados futuros modelos quanto à produção de enzimas de interesse biotecnológico (SILVA, 2006).

Na indústria de produção de combustíveis de segunda geração, o uso dessas enzimas tem sido analisado com o intuito de isolá-las, além de propiciar o desenvolvimento de estratégias para o crescimento diferenciado dos microrganismos a fim de deixá-los cada vez mais especializados na produção de enzimas para a degradação da biomassa vegetal (SILVA, 2006), principalmente quando se trata da produção do bioetanol 2G. Nesse sentido, podem ser destacadas a produção de celulases e hemicelulases pelos fungos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*,(LYND *et al.*, 2002) e bactérias *Geobacillus thermoleovorans*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1, *Clostridium* sp. TCW1, *Bacillus sp.*, *Paenebacillus sp.* (BHALLA *et al*, 2013), sendo alguns destes organismos utilizados na produção de enzimas recombinantes e nativas para a produção do bioetanol 2G (DE CASSIA PEREIRA, 2016).

1.4 Enzimas Oxidorredutases de Fungos

Os microrganismos que degradam a lignocelulose possuem um complexo sistema multienzimático que utiliza oxidorredutases e outras enzimas para degradação de lignina e polissacarídeos. Assim, pesquisas têm identificado a participação dessas proteínas na degradação da biomassa lignocelulósica e em outros processos como pigmentação em fungos, patogenicidade em plantas e degradação de compostos

aromáticos e xenobióticos. Em 2015, Fokina e colaboradores também apontaram a capacidade eletrocatalítica da lacase do fungo *Pycnoporus sanguineus* como biocátodo de células biocombustível.

Os Fungos produzem uma grande quantidade dessas enzimas lignocelulósicas, que apresentam alto potencial de aplicação em biotecnologia. Desse modo, fungos coletados em diferentes regiões do Brasil têm sido estudados e caracterizados para determinar sua habilidade na degradação de lignocelulose. Fungos filamentosos identificados no Brasil (por exemplo: *Trichoderma viridae*, *T. reesei*, *Fusarium oxysporium*, *Piptoporus betulinus*, *Penicillium echinulatum*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophillum*, *Clostridium straminisolvens*, *Thermonospora curvata*, etc) são reconhecidos por sua capacidade de produzir e secretar uma mistura diversa de enzimas para degradação de biomassa (VALENCIA e CHAMBERGO, 2013), sendo mais ou menos eficientes na secreção de algumas enzimas, limitando a eficiência do processo de hidrólise da biomassa como um todo (KUMAR et al., 2008). A purificação e avaliação de enzimas oxidorredutases de fungos como suplemento em coquetéis contribui para o conhecimento do complexo mecanismo de degradação de biomassa e potencializa o avanço dos estudos na indústria de produção do bioetanol 2G, uma vez que essas auxiliaram a degradação da lignina e maior exposição dos polímeros de carboidratos da celulose e hemicelulose.

Durante o desenvolvimento do projeto FAPESP 2014/24107-1, realizado no laboratório de Biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACHUSP), fungos filamentosos coletados no Estado de São Paulo foram testados quanto à sua capacidade catalítica na degradação de bagaço da cana-de-açúcar. A partir das análises feitas por Garcia (2018), foram selecionadas algumas cepas que cresceram em meio sólido com 1% de bagaço e apresentaram atividade de oxidorredutases observada em ensaio com incubação com os substratos DMP (ffatalato demetilo), guaiacol e ABTS, sendo a cepa BBF-245 – inicialmente descrito como *Pestalotiopsis* – uma das mais promissoras na produção de oxidorredutases nesse estudo.

Sabe-se que os *Pestalotiopsis* são fungos filamentosos que apresentam bastante potencial biotecnológico, existindo já estudos que avaliam a capacidade desse gênero em: degradar plástico (BHARDWAJ et al., 2013), produzir dibenzodioxicinonas (possíveis inibidores de transferases de éster de colesterol) (LIU et al., 2019), atuarem como antibióticos (SHARMA et al., 2016) e outras aplicações (ZHANG et al., 2017; NAGHDI et al., 2018).

Assim sendo, o BBF-245 foi escolhido como o fungo modelo para ser trabalhado no nosso estudo, posto que demostrou ser um produtor eficiente de enzimas lignocelulolíticas na degradação de biomassa vegetal. Desse modo, o presente trabalho tem como intuito avaliar a capacidade de produção de oxidorredutases por esse fungo, além de confirmar a identidade deste e isolar e caracterizar enzimas oxidorredutases (lacases) secretadas por essa cepa para a futura aplicação biotecnológica, principalmente na indústria do bioetanol 2G do bagaço da cana-de-açúcar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar a cepa BBF-245 e produzir, purificar e caracterizar enzimas oxidorredutases do fungo em estudo.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar, por taxonomia clássica e molecular, o fungo BBF-245;
2. Estabelecer condições de cultura para produção de enzimas oxidorredutases pelo fungo BBF-245;
3. Determinar a atividade das enzimas produzidas por BBF-245;
4. Purificar e determinar os parâmetros cinético-enzimáticos de oxidorredutases do BBF-245.

3. METÓDOS

3.1 Identificação taxonômica e molecular do fungo BBF-245

A cepa da Biblioteca de Fungos do laboratório de biotecnologia da EACH (BBF) utilizada no desenvolvimento dos estudos foi a BBF-245 foi coletada em um estudo anterior realizado em monumentos históricos na antiga zona do café no interior do estado de São Paulo.

3.1.1 Identificação morfológica

As características de crescimento da cepa em meio Potato Dextrose Agar (PDA, batata 200 g/L; dextrose 15 g/L e ágar 4 g/L), meio Malt Extract Agar (MEA - dextrose 20 g/L. peptona 6 g/L, extrato de malte 20 g/L e ágar 15 g/L) e Czapek Yeast Extract Agar (CYA – sacarose 30 g/L, extrato de levedura 5 g/L, nitrato de sódio 0,3 g/L, cloreto de potássio 0,05 g/L, sulfato de magnésio 0,05 g/L, sulfato de ferro 0,001 g/L, sulfato de zinco 0,001 g/L, sulfato de cobre 0,0005 g/L, hidrogenofosfato dipotássio 1 g/L e ágar 15 g/L) foram registradas durante 7 dias e comparadas com as características de fungos presentes na literatura. Os perfis microscópicos das colônias foram determinados pela técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950), no qual o micélio da cepa foi inoculado em PDA e uma lamínula foi posicionada sob a massa fúngica. A amostra foi mantida em placas de vidro a 30°C e em intervalos de 3 dias foi adicionada H_2O destilada para a manutenção da umidade. Posteriormente, as lamínulas foram coradas com azul de lactofenol e as estruturas vegetativas e reprodutivas foram observadas ao microscópio, fotografadas e comparadas às informações morfológicas de fungos presentes na literatura.

3.1.2 Identificação molecular

Para a identificação molecular foi realizada a extração de DNA fúngico (ZHANG et al., 2010). A cepa foi cultivada sob lâmina de papel celofane em PDA durante dois dias/30ºC. A massa de micélio foi triturada e transferida para microtubos de 1,5 mL, no qual foi adicionado 500 µL de tampão de extração (CTAB 3%; NaCl 1M 28%; EDTA 0.5M pH 8.0 4%; Tris-Cl 1M pH 8.0 10%; β-mercaptoetanol 0,2%). As amostras foram aquecidas durante 1 hora/ 65°C, após a incubação foi adicionado 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogenizado por 2 minutos em agitador Vórtex.

As amostras foram centrifugadas 16000 x g por 10 minutos; 400 µL foram transferidos a um novo microtubo, havendo nesse a adição de 500 µL de isopropanol. As amostras foram armazenadas durante 12 horas a 4°C. A solução foi centrifugada a 16000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA (precipitado) foi lavado com 500 µL de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 16000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 30 µL de água destilada estéril.

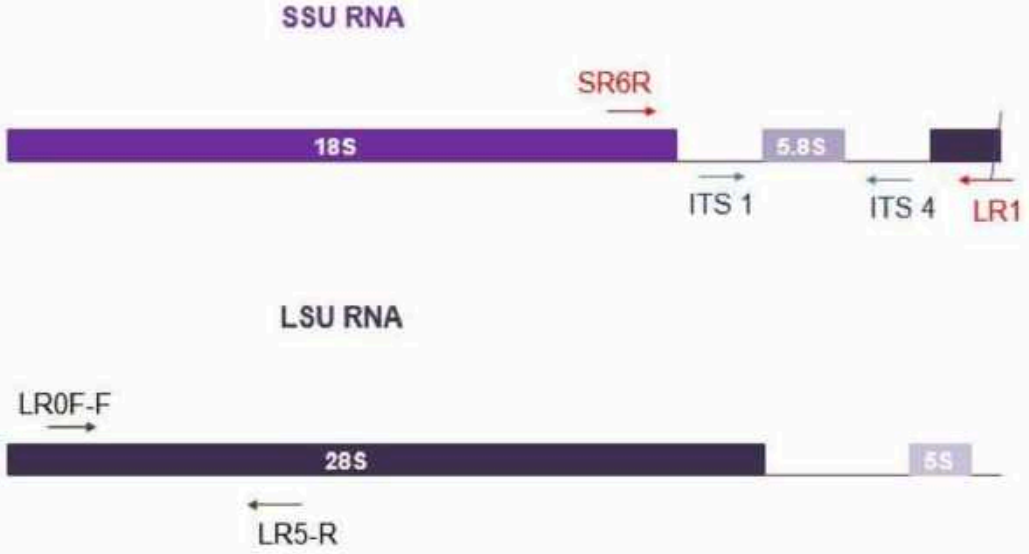
A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando oligonucleotídeos de sequências conservadas de DNA ribossomal (rDNA), seguindo os seguintes parâmetros: (1) desnaturação inicial a 95°C/3 minutos; (2) desnaturação a 95°C/3 minutos, anelamento a 42°C/30 segundos, extensão a 72°C/1 minuto; extensão final a 72°C/10 minutos. A região espaçadora interna transcrita (ITS Internal transcribed spacer), a subunidade maior de RNA (LSU, Large subunit RNA 25-28S) e a subunidade menor de RNA (SSU, Small subunit RNA 18S), foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos ITS-1 e ITS-4, LROR-F e LR5-R, SR6R e LR1 (Tabela 1), com o posicionamento representado na figura 12 (Vilgalys lab, Duke University, http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.html).

Tabela 1: Oligonucleotídeos usados na identificação do fungo BBF-245

Nome	Sequência de DNA (5' – 3')	Localização	Referência
ITS – 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	WHITE et al., 1990
ITS - 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	WHITE et al., 1990
LR0F - F	GTACCCGCTGAACTTAAGC	LSU	VILGAYS; HESTER, 1990
LR5 - R	ATCCTGAGGGAAACTTC	LSU	VILGAYS; HESTER, 1990
SR6R	AAGTATAAGTCGTAACAGG	SSU	WHITE et al., 1990
LR1	GGTTGGTTTCTTTCCT	LSU	WHITE et al., 1990

Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

Figura 12: Esquema de localização dos oligonucleotídeos no rDNA fúngico: SSU (Small subunitRNA) 18S, LSU (Large subunitRNA) 25-28S.



Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

As reações de sequenciamento foram realizadas empregando-se o kit de ddNTPs covalentemente ligados a agentes fluorescentes específicos para cada ddNTP (ABI Prism ® BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, Applied Biosystems Inc). As reações de extensão foram feitas em termociclador GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem Inc. O sequenciamento automático de DNA foi feito no sequenciador modelo 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc, da central analítica do IQ/USP. As sequências obtidas foram analisadas e comparadas por BLASTn.

As análises complementares realizadas na Fundação André Tosello (FAT, Campinas, SP, http://fat.org.br/), tinham como objetivo confirmar o resultado da identificação feita no laboratório. Na FAT o BBF-245 foi cultivado em meio líquido Sabouraud Dextrose Broth (SDB) para a extração do DNA utilizando o kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep (ZymoResearch), seguindo as informações do fabricante. O material coletado foi estocado a -20°C até a realização da PCR. A amplificação do DNA fúngico foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores SR6R

(5' AAGTATAAGTCGTAACAAGG 3') e LR1(5' GGTTGGTTTCTTTCCT 3') (WHITE et al., 1990), sendo confirmada por eletroforese em gel TBE-agarose 1,5% (p/v) e o DNA purificado por EasyPure PCR Purification Kit (TransGen Biotech), seguindo as instruções do fabricante. O produto da purificação foi dosado, aliquotado e sequenciado usando a plataforma ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). A sequência consenso foi gerada (BioEdit), comparada com as existentes no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) via MEGABLAST e alinhada com as mais próximas para a construção de uma árvore filogenética (dado em anexo) com o auxílio do programa MEGA7 (com parâmetro Jukes-Cantor e Bootstrap de 1000 réplicas).

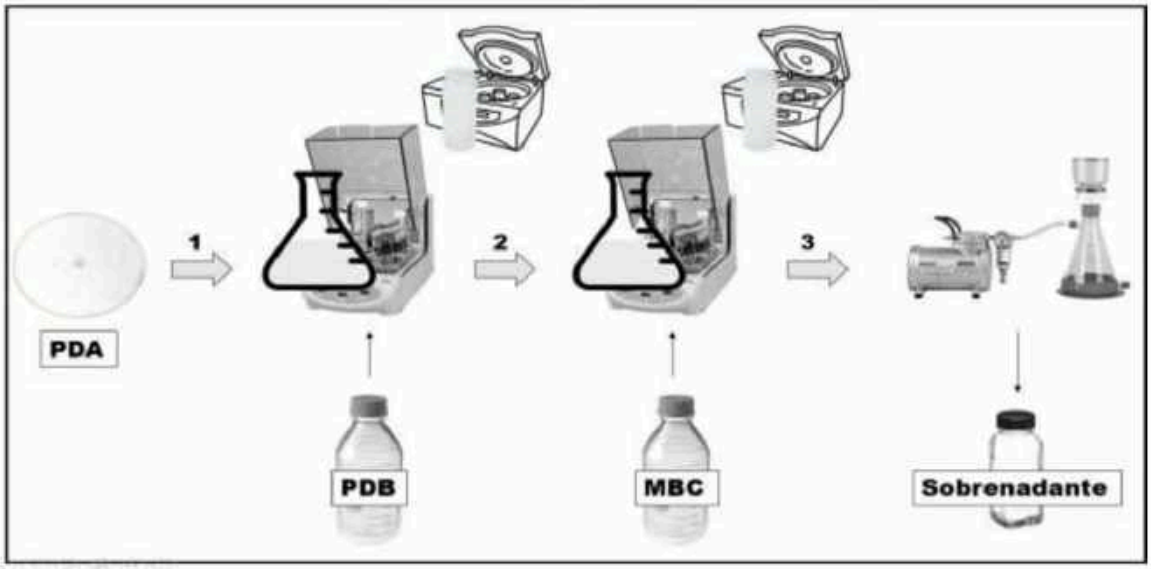
3.2 Cepas e condições de cultivo

A cepa do fungo *Pestalotiopsis* sp. foi mantida em placas estoque com meio PDA a 8°C. Para o crescimento do fungo em meio líquido Potato Dextrose Broth (PDB, batata 200 g/L e dextrose 15 g/L) foi utilizado 1cm³ da cultura em PDA do *Pestalotiopsis* sp., que foi incubado durante quatro dias a 150 rpm/ 28°C para a obtenção da massa micelial usada no cultivo em meio específico.

3.3 Crescimento de *Pestalotiopsis* sp. em meio com bagaço da cana-de-açúcar

Após 4 dias de crescimento em meio PDB foi obtida a massa micelial por centrifugação a 4700 x g/10 minutos, sendo essa transferida para o Meio Bagaço de Cana (MBC - uréia 0,3 g/L; sulfato de magnésio 0.3 g/L; sulfato de amônio 2,1 g/ L; cloreto de cálcio 1M 0,02%, solução de metais ($FeSO_4$ 0,5%; $MnSO_4$ 0,16%; $ZnSO_4$ 0,16%; e $CaCl_2$ 0,2%) em tampão fosfato de potássio 25mM pH 5 e 1% de bagaço da cana-de-açúcar in natura (fornecido pela Usina Granelli Ltda, São Paulo) esterilizado (modificado de Garcia, 2018). Alíquotas foram retiradas do quarto até o décimo dia de cultivo para análise da atividade enzimática (Figura 13).

Figura 13: Esquema das etapas de crescimento em meio líquido da cepa BBF245 (*Pestalotiopsis* sp.) para a produção de oxidorredutases.



1. Passagem de inoculo do meio sólido (PDA) para meio líquido (PDB) para obtenção de massa; 2. Separação do PDB da massa miceliar (centrifugação), que foi inoculada em meio com 1% de bagaço da cana-de-açúcar (MBC); 3. Separação do MBC da massa miceliar (centrifugação), obtenção do sobrenadante e filtração para retirada de impurezas e resquícios de massa fúngica. Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

3.4 Determinação da atividade de enzimas oxidorredutases

A detecção de atividade de enzimas oxidorredutases foi realizada em leitor de microplacas durante 10 ciclos de 30 segundos a 30°C.

Equação utilizada para o cálculo de atividade de oxidases (CAPLAN et al., 1995):

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

Em que:

Δ ABS = Curva de inclinação da absorbância durante 5 minutos. ε

= Coeficiente de extinção molar.

R = Quantidade de extrato enzimático na amostra.

U/L = Unidades por litro, no qual U é referente à quantidade de enzima capaz de converter 1µMol de produto por minuto.

Coeficiente de absorção molar:

ε 420 nm = 36.000 L . M . cm $^{-1}$

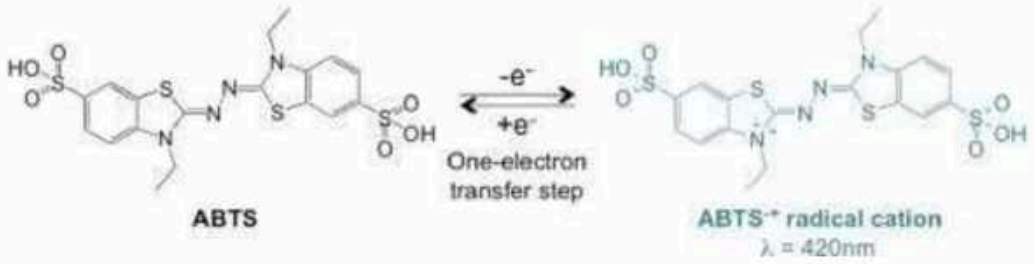
ε 465 nm = 12.100 L . M . cm $^{-1}$

ε 310 nm = 9.300 L . M . cm $^{-1}$

3.4.1 Lacase

A detecção da atividade de lacases (Lac) realizou-se segundo Collins (1998). Foi adicionado em cada poço: tampão tartarato de sódio 250 mM pH 4.2, extrato enzimático e 5mM de 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS). A solução foi incubada durante 3 minutos a 30°C e a reação foi iniciada adicionando água destilada. A atividade foi monitorada a 420 nm a partir da oxidação de ABTS em ABTS+ (Figura 14).

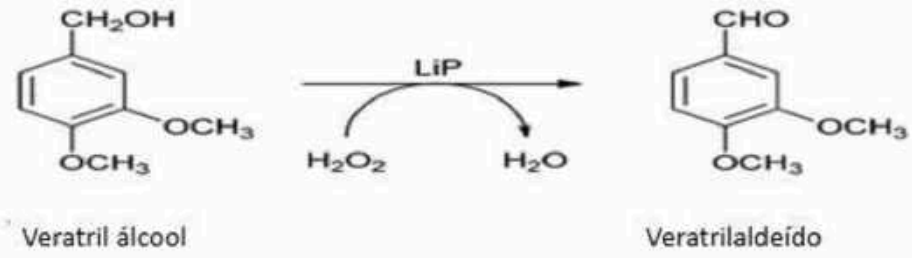
Figura 14: Conversão do ABTS a ABTS+ por ação da atividade de lacases.



3.4.2 Lignina Peroxidase

A detecção da atividade de lignina peroxidases (LiP) foi realizada de acordo com o protocolo de Tien e Kirk (1988). Foi adicionado em cada poço: tampão tartarato de sódio 250 mM pH 4.2, veratril álcool 100 mM e extrato enzimático. A solução foi incubada durante 3 minutos a 30°C e a reação foi iniciada adicionando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 1mM. A atividade foi monitorada a 310 nm a partir da oxidação de veratril álcool em veratrilaldeído (Figura 15).

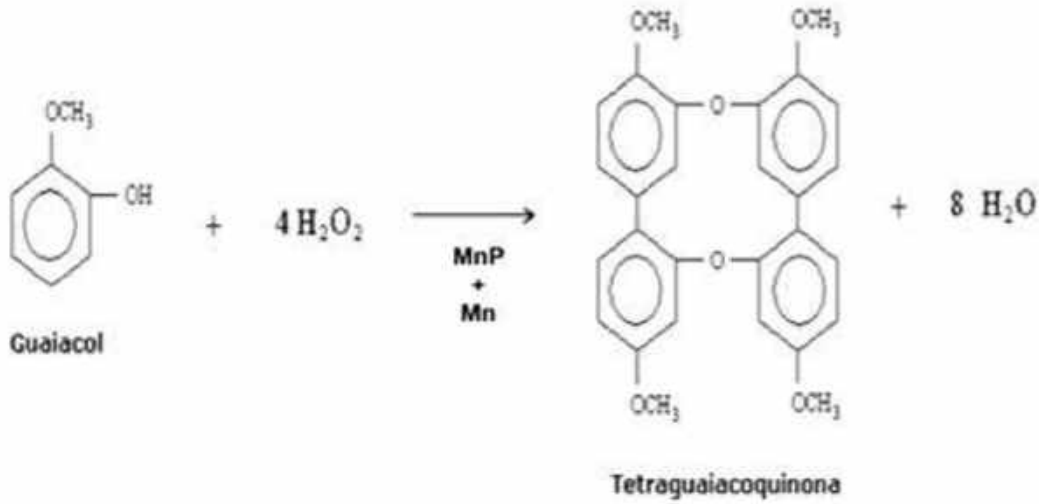
Figura 15: Conversão do veratril álcool a veratrilaldeído por ação da atividade de lignina peroxidases.



3.4.3 Manganês Peroxidase

A detecção da atividade de manganês peroxidases (MnP) foi realizada segundo o protocolo de Hwang et al. (2008). Foi adicionado em cada poço: tampão tartarato de sódio 250 mM pH 4.2, guaiacol 400 mM, sulfato de manganês 10 mM e extrato enzimático. A solução foi incubada durante 3 minutos a 30°C e a reação foi iniciada adicionando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 1mM. A atividade foi monitorada a 465 nm a partir da oxidação do guaiacol em 3,3'-dimethoxi-bifenol-4,4'-quinona (Figura 16).

Figura 16: Conversão do guaiacol a 3,3'-dimethoxi-bifenol-4,4'-quinona (tetraquinona) por ação da atividade de manganês peroxidases.



3.4.4 Cinética-enzimática

A influência da concentração de substrato na velocidade de reação foi determinada em ensaio com a variação da concentração do substrato ABTS (0,5mM a 50Mm). Para cada concentração do substrato foi analisada a atividade da enzima a

partir da reação descrita no 3.4.a. O Km e Vmax, foram estimados por meio dos gráficos de Michaelis-Menten plotados no programa GraphPad Prism 4. Os ensaios foram realizados em três ensaios em triplicata e os desvios entre os poços foram considerados na montagem da curva de Michaelis-Menten. Os valores de kcat foram obtidos através da relação da Vmax pela concentração proteica, enquanto a constante de especificidade para as enzimas foi calculada pela razão entre kcat e Km.

3.5 Concentração de proteínas

O sobrenadante da cultura de *Pestalotiopsis* sp. foi centrifugado a 4700 x g/ 4°C por 10 minutos e filtrado em membrana de 47 mm no quarto dia em meio MBC, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante congelado em garrafas vedadas com parafilme para a liofilização. Após o congelamento completo do sobrenadante, as garrafas foram colocadas no liofilizador freezone 2.5 (LABCONCO) a temperatura de -50°C e vácuo de 0,004 mBar, permanecendo no equipamento até a desidratação completa da amostra.

3.6 Purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica

Foi realizada a purificação das proteínas presentes no sobrenadante da cultura do fungo *Pestalotiopsis* sp. por cromatografia de troca iônica com a coluna de 10mL Q-sepharose FF (GE Healthcare) no cromatógrafo AKTA FPLC (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com 3 volumes de coluna (VC) de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8.0 (tampão A: de equilíbrio e lavagem).

O sobrenadante do quarto dia de cultura foi centrifugado a 4700 x g durante 10 minutos, filtrado em membrana de 47mm, liofilizado e suspendido em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8, para então ser centrifugado a 12000 x g por 10 minutos e filtrado em filtro de 45 µm para ser injetado na coluna a um fluxo de 1 mL/min. A lavagem foi feita com 3 VC de tampão A e a eluição foi realizada em etapas escalonadas utilizando Tris-HCl 20 mM pH 8.0 com NaCl 1M (tampão B: de eluição). O passo de eluição aconteceu

com 2 VC de tampão B a 25%, 2 VC de tampão B a 50%, 2 VC de tampão B e, por fim, 2 VC de tampão B a 100%. O processo foi monitorado a 280 nm e as frações que apresentaram os maiores picos de eluição foram coletadas para realização dos ensaios de atividade enzimática para a detecção da presença da proteína de interesse.

3.7 Zimograma

Após a detecção da presença de lacases nas frações obtidas em cromatografia foi realizada a análise da atividade enzimática em gel dessas proteínas. As frações coletadas foram dialisadas, para a retirada do NaCl, e receberam a adição de tampão de amostra sem SDS (0,05g de azul de bromofenol, 16,5 mL de glicerol 30% e 50 mL de Tris-HCl 50mM pH 6,8) para a aplicação em gel de poliacrilamida 10% (0,99mL de Tris-HCl 0,5M pH 8,8; 0,425mL de glicerol 85%; 2,38mL de Bis-Acrilamida; 0,625mL de Tris-HCl 0,5M pH 6,8; 41,25µL de persulfato de amônio 20%; 20µL de TEMED e o volume completado com H_2O destilada) sem SDS (Dodecil sulfato de sódio), sendo realizada a corrida em condições não desnaturantes a 4°C em 50V durante 8 horas.

Após a corrida, o gel foi submetido a duas lavagens em tampão tartarato de sódio 50 mM, pH 4.2 durante 1 hora e, em seguida, passou por uma incubação de 30 minutos em solução de ABTS 2 mM a 37 °C na ausência de luz. Foi observado o surgimento de bandas verdes após o tempo de incubação, indicando a atividade de lacases das frações assim como descrito por Garcia, 2018.

3.8 Eletroforese em Gel de poliacrilamida

Foram utilizados 25 µL de cada fração obtida na cromatografia de troca iônica juntamente com 25 µL de tampão de amostra (1g SDS; 0,05g de azul de bromofenol; 16,5 mL de glicerol 30%; 50 mL de Tris-HCl 50mM pH 6,8; e a cada 1 mL de solução, 50µL de β-mercapetanol); a mistura então foi aquecida a 100°C em bloco seco durante

cinco minutos e aplicada em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS, de acordo com o proposto por Laemmli (1970). Durante duas horas o sistema de eletroforese foi mantido a 80V em solução de corrida (14,4g de glicina, 3g de Tris-HCl e 1g de SDS). Após o termino da corrida o gel foi colocado em solução corante (50 mL de metanol, 10 mL de ácido acético, 40 mL de água destilada e 0,2g de comassie blue G250) e mantido em agitação constante até o aparecimento das bandas. O gel de eletroforese foi, então, colocado em solução descorante (25 mL de metanol, 6 mL de ácido acético e 29 mL de água destilada) para melhor visualização das bandas proteicas e após a descoloração foi realizada a revelação deste com nitrato de prata. O gel em condição desnaturante foi mantido em agitação durante vinte minutos em solução de metanol 40% e depois lavado com água destilada três vezes (passo repetido entre as trocas de soluções); em seguida foi submetido a imersão em solução de tiossulfato de sódio (0,01g de tiossulfato de sódio e 50 mL de água destilada) durante um minuto em agitação constante.

Após a retirada da solução de tiossulfato de sódio e a realização das lavagens, houve a adição de solução de nitrato de prata (0,1g de nitrato de prata, 37µL de formaldeído e 50 mL de água destilada), que foi incubada durante trinta minutos em agitação constante e, por fim, depois da realização das lavagens, foi adicionada solução de revelação (2g de carbonato de sódio, 1 mL da solução de tiossulfato de sódio, 25 µL de formaldeído e 50 mL de água destilada), mantendo-se a agitação até o aparecimento das bandas proteicas e sendo feita a parada da reação com solução descorante.

3.9 Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas totais foi realizado o método de Bradford (1976), utilizando-se o kit de quantificação de proteínas da BIO-RAD (reagente de Bradford na proporção de 1:4), sendo usado como padrão curva de concentrações conhecidas de Albumina Sérica Bovina (BSA) e as leituras realizadas em 595 nm em leitora de placas. Para a reação foram adicionados 10 µL de amostra para 200µL de

reagente de Bradford, além da dosagem realizada a 280nm em NanoDrop Thermofisher com os as lacases isoladas.

3.10 Avaliação do efeito do pH e temperatura nas lacases isoladas

A avaliação do efeito do pH e temperatura das enzimas isoladas foi realizada pela quantificação da atividade enzimática em diferentes faixas de pH (variando de 312) e temperaturas (20-80°C).

O efeito do pH foi avaliado com a reação enzimática ocorrendo nas condições citadas em 3.4.a., com a substituição do tampão tartarato de sódio por tampão borato fosfato de sódio (PBA) 20mM, que possui uma ampla faixa de pH indo do 3 ao 12. Já o efeito da temperatura na atividade das enzimas foi avaliado após a incubação dessas em temperaturas variando de 20°C até 80°C durante duas horas, com intervalos de trinta minutos para a retirada de cada amostra, sendo então calculada a atividade remanescente percentual dessas enzimas.

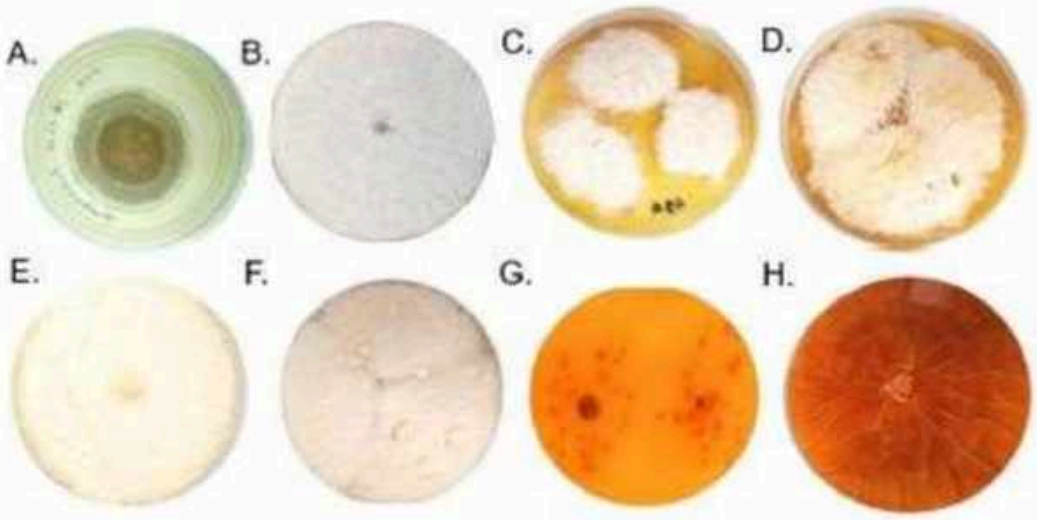
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação da cepa BBF-245

A cepa do fungo BBF-245 (da micoteca do laboratório de biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades-USP (EACH/USP)) foi isolada e identificada parcialmente durante o desenvolvimento da dissertação "Enzimas Oxidorredutases Produzidas Por Fungos Filamentosos" (GARCIA, 2018), na qual foram realizadas análises morfológicas e moleculares que apontaram a cepa como uma representante do gênero *Pestalotiopsis*. Assim sendo, durante este trabalho foram feitas análises suplementares, com diferentes marcadores moleculares em relação àqueles utilizados no estudo citado acima, no laboratório de biotecnologia (EACH/USP, São Paulo, SP) e na Fundação André Tosello (FAT, Campinas, SP, http://fat.org.br/), para a confirmação da identidade do fungo em estudo.

Quanto à morfologia do macrocultivo fúngico (Figura 17), observou-se em meio sólido, no anverso das placas, que a colônia apresentou coloração de tons branco e creme, com textura membranosa e aparência algodoada (Figura 17 B,C,D,E e F), estando totalmente expandida na placa depois de 7/10 dias de incubação a 30°C; enquanto no verso notou-se a formação de anéis concêntricos durante expansão, com essa característica podendo ser vista desde os primeiros dias de crescimento (Figura 17 A e H). A partir do vigésimo dia de macrocultivo foi observado o surgimento de pigmentos globosos de cor amarronzada e preta, estruturas que foram identificadas como os conidiomas do espécime analisado (Figura 17 G)
(MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014; GARCIA, 2018).

Figura 17: Placas de cultivo da cepa BBF-245.

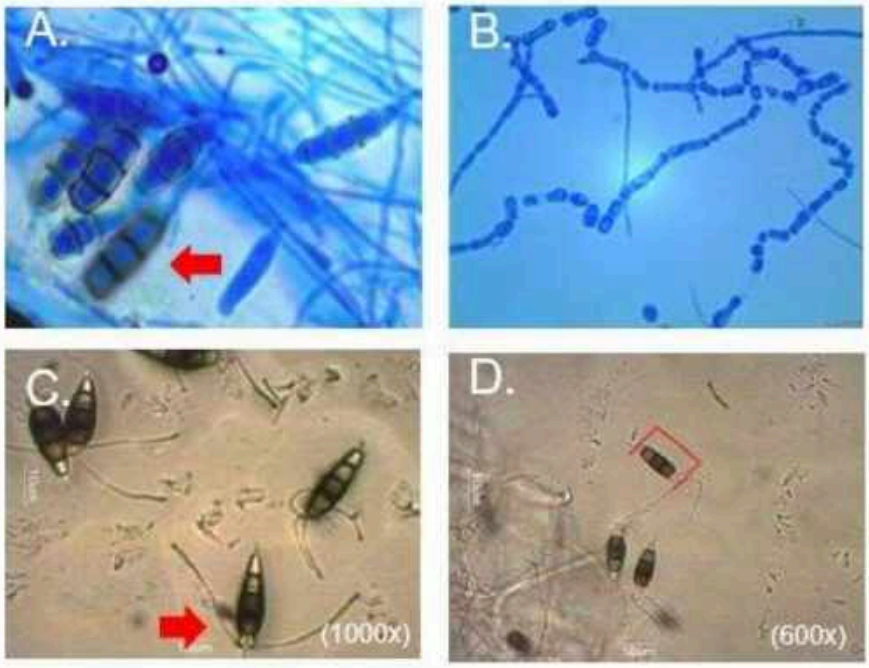


Anverso: **A**. e **B.** 4° e 7° dia de Cultivo em PDA a 30°C; **C.** e **D.** 21° dia de Cultivo em CYA a 24°C; **E.** 10° dia de Cultivo em PDA a 30°C; **F.** 21° dia de Cultivo em MEA a 24°C; **G.** Conidiomas de Cultivo de 20º dia em PDA e, Verso: **H.** 7° dia de Cultivo em PDA a 30°. Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

Já na avaliação em microscópio do BBF-245, foi observada a presença de células conidiogênicas septadas (Figura 18), apresentando essas aspecto bacilar com três a cinco septos – sendo os septos da extremidade transparentes e os centrais marrons – (Figura 18 A), com apêndices apicais semelhantes a antenas (Figura 18 C), que diferiam quanto ao número e comprimento nas células observadas.

Os aspectos verificados no BBF-245 levaram à conclusão de que este trata-se de um representante do gênero *Pestalotiopsis* (JEEWON et al., 2003), como Garcia (2018) já havia apontado, uma vez que a cepa apresentou todas as características associadas à morfologia do conídio (JEEWON et al., 2003; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014) e macromorfologia atribuídas aos *Pestalotiopsis* (SUWANNARACH et al., 2013; ARA et al., 2017; AZLAN et al., 2018) (Figura 19).

Figura 18: Microcultivo do BBF-245.



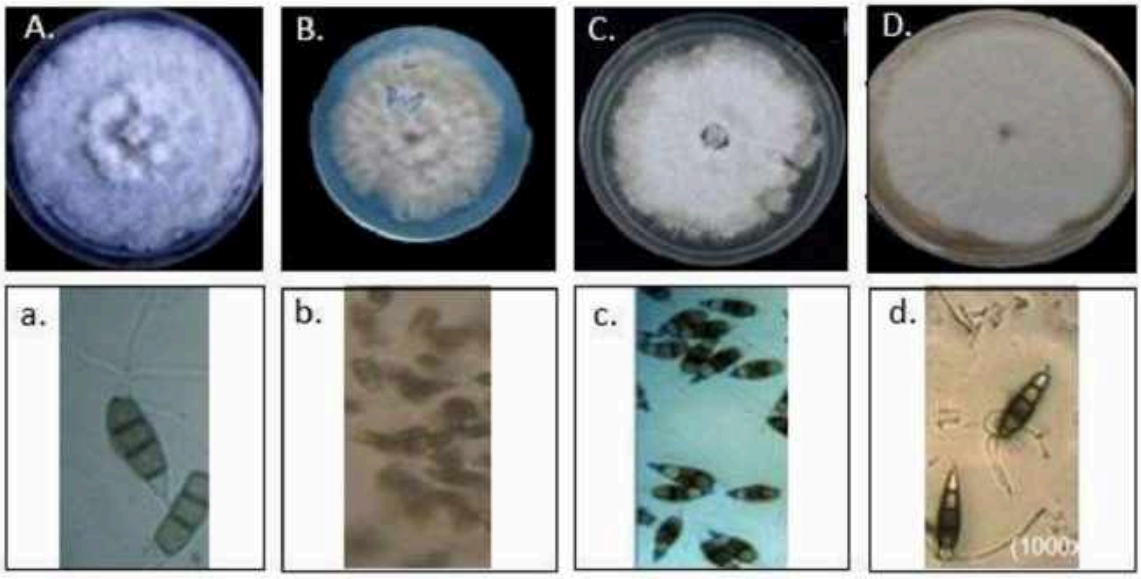
A. e **B.** Microcultivo em coloração de lactofenol azul de algodão, seta indicando células conidiogênicas, em aumento 1000x e 400x, respectivamente; **C.** Conidióforos em aumento 1000x. seta indicando apêndices apicais e **D.** Microcultivo em G25N (25% Glicerol Nitrate Agar) 600x, conidióforo destacado, com a presença de três septos amarronzados com extremidades apicais claras. Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

Contudo, não foi possível a determinação da espécie por meio da análise morfologia do BBF-245, uma vez que a cepa não apresentou nenhum elemento de diferenciação específico que levasse à conclusão da sua identidade, caso comum entre os representantes deste gênero, pois a proximidade filogenética entre esses organismos leva a pouca disparidade morfológica e a ambiguidade no momento de caracterização das espécies (NAG REAJ, 1993; SUTTON, 1980; JEEWON et al, 2003).

Na figura 19, estão dispostos quatro *Pestalotiopsis* diferentes – incluindo o BBF-245 – para a comparação entre a morfologia das colônias e conídios desses fungos. Nota-se que (juntamente com o BBF-245, figura 19 D e d) dois dos fungos representados não foram identificados até espécie (Figura 19 B,b,C e c) e que todas as colônias possuem aspecto algodoado, coloração próxima ao branco e conídios de

aspecto característico do gênero (SUWANNARACH et al., 2013; ARA et al., 2017; AZLAN et al., 2018); isso se dá graças ao fato de os *Pestalotiopsis* estarem enquadrados dentro de um clado monofilético (JEEWON, 2003), os tornando fenotipicamente parecidos e dificultando a identificação dessas espécies por taxonomia clássica.

Figura 19: Comparativo de morfologia e conídios de *Pestalotiopsis*.



A. Anverso da placa em PDA de *Pestalotiopsis theae*. **a.** Conídios do *Pestalotiopsis theae* (Adaptado de SUWANNARACH et al., 2013); **B.** Anverso da placa em PDA de *Pestalotiopsis* sp. **b.** Conídios do *Pestalotiopsis* sp. (Adaptado de ARA et al., 2017); **C.** Anverso da placa em PDA de *Pestalotiopsis* sp. **c.** Conídios do *Pestalotiopsis* sp. (Adaptado de AZLAN et al., 2018); **D.** Anverso da placa em PDA do BBF-245. **d.** Conídios do BBF-245 (o estudo). Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

A classificação baseada nos caracteres morfológicos em geral possui o problema de definição plena da identidade de um organismo por causa da pouca divergência estrutural entre algumas espécies (KRUSCHEWSKY, 2010), podendo a

existência de baixa variação ser significante ao ponto de levar ao questionamento da identidade do indivíduo em estudo (RUSSELL et al., 2004). Por isso, o emprego de técnicas de identificação através da análise molecular é utilizado com o intuito de validar as informações vista por microscopia e cultivo a olho nu (RUSSELL et al., 2004).

Sabendo-se disso, foi realizada, também, a análise molecular da região 28S rDNA (LSU - *Large subunit* RNA) e 18S rDNA (SSU - *Small subunit* RNA) da cepa BBF-245 para a determinação da espécie. Na dissertação de Garcia (2018), o microrganismo em estudo foi enquadrado como diferentes espécies do gênero *Pestalotiopsis* e *Neopestalotiopsis*, não havendo consenso quanto à identidade quando analisados os genes correspondentes a β-tubulina, ao fator de elongação, região ITS e LR. Durante os novos ensaios, utilizando os oligonucleotídeos listados na tabela 1, também não foi possível a determinação da espécie, sendo assim o fungo denominado como *Pestalotiopsis* sp. (Tabela 2), resultado que deixa em aberto a espécie do BBF-245, podendo este ser um indicativo de que a cepa pertence a uma espécie ainda não descrita de *Pestalotiopsis*, devido a variação, proximidade e características do fungo com espécies observadas na análise comparativa da sequência obtida com as do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Tabela 3); no entanto, seriam necessárias mais análises para confirmar a identidade do BBF-245 (árvore filogenética do BBF-245 presente no anexo II).

Tabela 2: Classificação taxonômica do BBF-245.

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
REINO	Fungi
FILO	Ascomycota
SUBFILO	Pezizomycotina
CLASSE	Sordariomycetes
SUBCLASSE	Xylariomycetidae
ORDEM	Xylariales
FAMÍLIA	Sporocadaceae
GÊNERO	*Pestalotiopsis*
ESPÉCIE	sp

Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

Tabela 3: Análise comparativa da sequência de rDNA do fungo BBF-245 com outros organismos presentes no NCBI.

ORGANISMO	REGIÃO rDNA	QUERY COVER	ID*	Nº DE ACESSO
***Pestalotiopsis protearum* CPC1765**	ITS	94%	99%	JN712498.1
***Neopestalotiopsis eucalypticola* CBS264.37**	ITS	94%	99%	KM199376.1
***Neopestalotiopsis formicarum* CBS362.72**	ITS	93%	99%	NR145242.1
***Pestalotiopsis* sp. YS-2014**	SSU	90%	99%	KJ023087.1
***Pestalotiopsisknighta* CBS1141338**	SSU	91%	92%	KM199310.1
***Pestalotiopsis biciliata* CBS124463**	SSU	89%	93%	KM199308.1
***Pestalotiopsis clavispora* 39120**	LSU	93%	96%	JN940829.1
***Neopestalotiopsis egyptiaca* CPC26133**	LSU	93%	96%	KT9580861.1
***Neopestalotiopsis egyptiaca* CPC26132**	LSU	93%	96%	KT950860.1

Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

ID*: Identidade

Sequências obtidas do NCBI (*National Center foir Biotechnology Information*, USA) e comparadas com a da cepa BBF-245 no BLASTn

O gênero *Pestalotiopsis* possui, aproximadamente, 234 espécies descritas (KRUSSCHEWSKY, 2010), são ascomicotas cosmopolitas, constituídos em sua maioria por fitopatógenos e parasitas vegetais (Figura 20) (XU et al, 2014). O gênero é conhecido por secretar de diferentes produtos naturais (MAHARACHCHIKUMBURA et al, 2011; WANG et al, 2015; ZHANG et al, 2018), existindo relatos da produção de uma grande variedade de metabólitos secundários usados como anticancerígenos,

antibióticos, antidiabéticos, entre outras aplicações industriais e farmacológicas (KRUSCHEWSKY, 2010; XU et al, 2014).

Figura 20: Sintomas de fitopatologias atribuídas ao gênero *Pestalotiopsis*.

A: manchas na falha de *Mangifera indica*; **B**: mancha clara em folha de *Camellia sirensis*; **C**: mancha clara em folha de *Camellia japonica*; **D**: Clareamento da extremidade da folha de *Podocarpus macrophyllus*; **E**: aparência de desgaste amarronzado no entorno da folha de *Rhododendron sinogrande*; **F**: morte de folhas de *Mangifera indica*; G: pontos negros no fruto de *Psidium guajava*; **H**: apodrecimento do fruto de *Syzygium samarangense*. (Imagem de MAHARACHCHIKUMBURA S.).

A produção de moléculas bioativas por *Pestalotiosis* é conhecida há mais de vinte anos (YANG et al, 2012) e, desde então, o estudo do papel biológico das moléculas secretadas por esse gênero vem sendo bastante explorado (FIGUEIREDO et al, 2007; XU et al, 2014; YANG et al, 2012; JAYAWARDENA et al, 2015), sendo o taxol ou paclitaxel (usado no tratamento do câncer) um dos produtos mais conhecidos derivado desses fungos (YUAN et al, 2006), bem como o pestaloside, a hidropestalipirina e outras moléculas (LEE et al, 1996; STROBEL et al, 1997). Porém, quando se trata dos *Pestalotiopsis*, também deve ser levada em consideração a alta maleabilidade adaptativa do gênero em conjunto com o hospedeiro, pois Yang e colaboradores

(2012) já propunham a habilidade de "poder de captura" do DNA das plantas que parasitavam, passando a produzir, a partir daí, os compostos do hospedeiro (caso do *Pestalotiopsis microspora* que passou a produzir taxol a partir da informação genética de *Taxus brevifolia*).

Por causa da alta dispersão, grande número de espécies e capacidade de produção de metabólitos secundários, esse gênero torna-se interessante para o desenvolvimento de estudos e avaliação da sua aplicação biotecnológica em diversas áreas (YANG et al., 2012, CHAMBERGO e VALENCIA, 2013; YANTO et al., 2014; CORRÊA et al., 2014; WANG et al., 2016).

4.2 Atividade de oxidorredutases pelo fungo *Pestalotiopsis* sp.

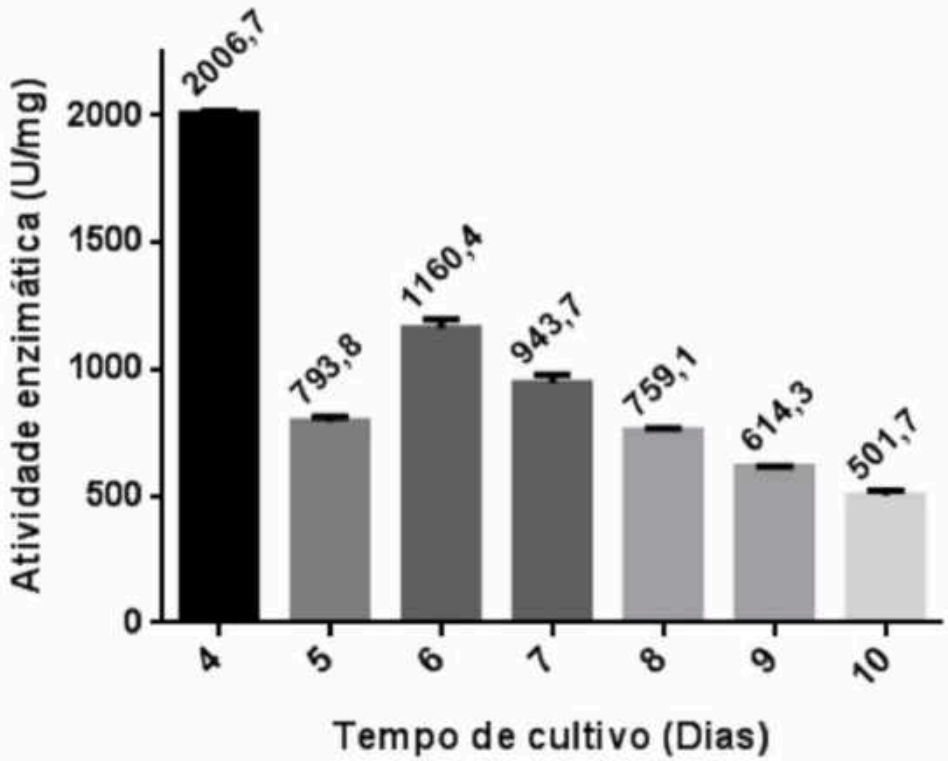
Os ascomicotas, como o *Pestalotiopsis* sp., são fungos considerados produtores de enzimas que promovem reações redox (multicobre oxidases (lacases), peroxidases, peroxigenases e monoxigenases) para degradação de biomassa (MARTINEZ et al., 2017; PATEL et al., 2016; MISHRA et al., 2017; POLLEGIONI et al., 2015). Atualmente, os fungos de podridão branca são os que apresentam o sistema de deslignificação mais conhecido e eficiente (WAN e LI, 2012), porém cada vez mais o estudo de novos grupos vem mudando esse panorama e apresentando novos organismos com potencial na produção de um complexo enzimático lignocelulósico eficaz na degradação de biomassa (WAN e LI, 2012; KUMAR et al., 2008).

No presente trabalho foi analisada a produção de enzimas oxidorredutases pelo fungo *Pestalotiopsis* sp. (BBF-245) em meio MBC com 1% de bagaço da cana-de-açúcar por dez dias sob agitação e temperatura constantes (dados utilizados na plotagem dos gráficos no anexo V), sendo observado que a cepa utilizada produziu algumas das enzimas citadas acima, com o quarto dia em MBC apresentando a maior atividade em U/mg de lacases (Figura 21), enzimas as quais possuem maior expressividade dentre as oxidorredutases nos trabalhos com fungos publicados até a data (CHEN et al., 2011; YANTO et al., 2013; GUO et al., 2018; YADAV et al., 2019; ARFI et al., 2013). Para o estabelecimento do MBC e da concentração de biomassa

vegetal utilizada foram realizados testes quanto à composição final do meio para a produção de oxidorredutases, sendo variada a concentração de bagaço (0,5 e 1%), e estudo da influência da adição de sulfato de cobre e veratril álcool como indutores; contudo, não houve aumento da secreção das enzimas com o acréscimo dessas substâncias e o percentual de bagaço da cana-de-açúcar (1%) foi no qual observouse maior liberação dessas enzimas. Também foi comparada a secreção de oxidorredutases em meio MBC com lignina pura nas mesmas condições de agitação e temperatura dos outros testes, no entanto os valores de secreção continuaram sendo superiores para o *Pestalotiopsis* sp. quando a fonte de carbono do meio foi o bagaço da cana-de-açúcar.

O sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp. apresentou atividade enzimática de lacases igual a 2.006,7 U/mg no quarto dia de cultivo em MBC, havendo nos dias seguintes uma queda significativa da atividade, sendo o sexto e sétimo dias aqueles com os valores mais próximos ao quarto dia (1.160,43 e 943,72 U/mg, respectivamente) e o décimo com o mais distante (501,76 U/mg) (Figura 21). Em um estudo de 2006, o representante de *Pestalotiopsis* foi o que apresentou, dentre outros quatro fungos (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Aspergillus*), o maior valor de atividade enzimática de lacases (560 U/L) (HAO et al., 2006), sendo ele considerado como o mais eficaz na degradação da lignocelulose. Assim como aconteceu com Hao e colaboradores, quando foi analisado o perfil de secreção de lacases, houve um primeiro pico de atividade do sobrenadante (nono dia (HAO et al, 2006) e quarto dia (o estudo)) seguido de queda gradativa até o final do experimento.

Figura 21: Atividade (U/mg) de lacases quantificada do sobrenadante da cultura de *Pestalotiopsis* sp. em meio MBC com 1% de bagaço da cana-de-açúcar estéril durante dez dias de cultivo em agitação e temperatura constantes.



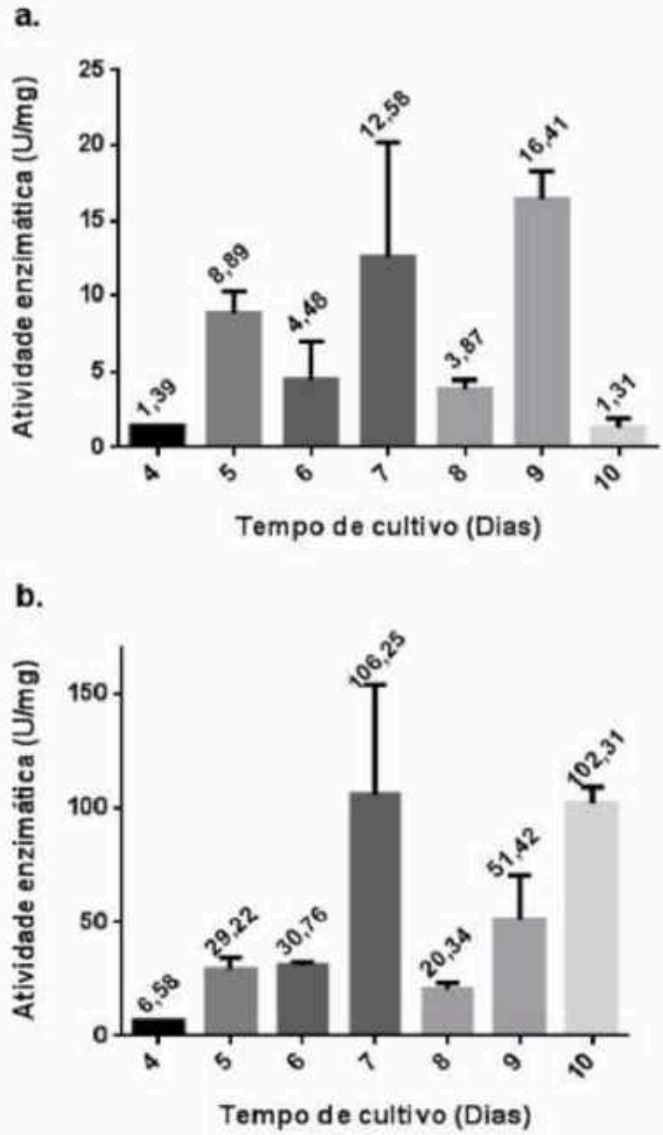
Valores em U/mg das frações dos dias 4 (2.006,7 ± 12,12), 5 (793,85 ± 16,6), 6 (1.160,43 ± 36,85), 7 (943,72 ± 34,69), 8 (759,13 ± 8,54), 9 (614,30 ± 1,44) e 10 (501,76 ± 20,27). Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

Além da catálise nas reações para degradação de lignina, a secreção de Lac por *Pestalotiopsis* já foi estudada em outras aplicações, como em um trabalho de análise da eficiência de alguns fungos para a decomposição do asfalto, no qual o *Pestalotiopsis* NG007 apresentou 0,16 U/g de Lac, constituindo-se este em um dos maiores produtores de lacases e o mais eficiente na degradação do asfalto (aproximadamente 70%) no estudo (YANTO et al., 2014); ou, ainda, como no artigo de Hao e colaboradores (2007), no qual um *Pestalotiopsis* sp. atuou na remoção de corantes industriais apresentando 32700 U/L de Lac, valor superior ao visto para fungos como *Trametes versicolor*, *Trametes modesta* e outras espécies que são consideradas modelos para a produção dessas enzimas na literatura.

No que se refere à atividade de peroxidases de lignina e manganês do sobrenadante analisado, o perfil observado foi bastante diferente daquele visto em relação às lacases, sem linearidade com o decorrer dos dias e com valores bastante inferiores quando comparados ao encontrado para a multicobre oxidase (Lac). A não homogeneidade na produção de oxidorredutases pelos organismos já é discutida, uma vez que existe uma variação de produção das enzimas catalizadoras da clivagem de lignina (RUTTIMANN-JOHNSON et al., 1993; WAN e Li, 2012) entre os fungos, sendo possível ou não a expressão de um ou mais grupos de oxidorredutases em um mesmo indivíduo.

Existem poucas publicações que trazem os valores de peroxidases produzidas por *Pestalotiopsis* (ARFI et al., 2013), sendo, de acordo com a literatura, esperada a baixa produção dessas enzimas por esse gênero. Em 2019, Geetha e colaboradores apontaram a produção de outras oxidorredutases, como as ascorbato peroxidases e catalases pelo *P. microspora* TKBRR, enquanto em um trabalho que analisou a degradação de serapilheira o *Pestalotiopsis* sp. foi um dos organismos que apresentou os menores valores de LiP e MnP (HAO et al., 2006), corroborando com os dados atualmente presentes na literatura.

Figura 22: Atividade (U/mg) de manganês peroxidases **(a.)** e Lignina peroxidases **(b.)**.



Manganês peroxidases **(a)** (valores em U/mg das frações dos dias 4 (1,39), 5 (8,90 ± 1,39), 6 (4,48 ± 2,53), 7 (12,58 ± 7,62), 8 (3,87 ± 0,60), 9 (16,42 ± 1,88) e 10 (1,31 ± 0,62)) e lignina peroxidases **(b)** (valores em U/mg das frações dos dias 4 (6,58), 5 (29,22 ± 4,49), 6 (30,76 ± 1,49), 7 (106,25 ± 48,08), 8 (20,34 ± 2,87), 9 (51,42 ± 19,29) e 10 (102,31 ± 7,31)) quantificadas do sobrenadante da cultura de *Pestalotiopsis* sp. em meio MBC com 1% de bagaço da cana-de-açúcar. Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2019.

A atividade de MnP mais alta no estudo foi medida no nono dia de cultivo (16,42 U/mg), enquanto o décimo dia foi o com menor valor mensurado durante a análise

(1,31 U/mg), seguido do quarto dia (1,39 U/mg). Em contrapartida, para as lignina peroxidases houve um aumento da atividade no sobrenadante até o sétimo dia (6,58 U/mg, 29,22 U/mg, 30,76 U/mg e 106,25 U/mg, do 4º até o 7º dia, respectivamente), seguido de queda no oitavo dia e novo aumento até o último dia de cultivo (20,34 U/mg, 51,42 U/mg e 102,31 U/mg, do 8º até o 10º dia, respectivamente) (Figura 22). Não foi possível observar um padrão na secreção das peroxidases analisadas durante o ensaio, podendo esse fato ser atribuído à competição existente na cultura entre as oxidorredutases e celulases pelo substrato, inibição pela ação de outras enzimas e/ou pelos produtos liberados com a passar dos dias de experimento, uma vez que a atividade de lacases no sobrenadante já estava expondo os polímeros glicídicos e degradando parte da lignina do bagaço utilizado como suplemento. Os resultados obtidos de secreção de peroxidases atenderam ao padrão esperado na literatura para esse gênero.

Portanto, com os dados de atividade enzimática obtidos durante o trabalho, as enzimas lacases foram selecionadas para o prosseguimento dos ensaios, considerando-se que essas foram as proteínas que, além de apresentarem maiores valores de atividade, apresentaram também um padrão constante de secreção pelo fungo.

4.3 Isolamento de lacases nativas do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp.

Com a análise realizada do padrão de secreção enzimática do *Pestalotiopsis* sp. (BBF-245) em cultivo com 1% de bagaço da cana-de-açúcar, percebeu-se que a maior produção enzimática de lacases deu-se no quarto dia, sendo a atividade mensurada desse grupo de enzimas superior às outras oxidorredutases avaliadas no estudo e, portanto, ele foi o escolhido para a continuidade do trabalho.

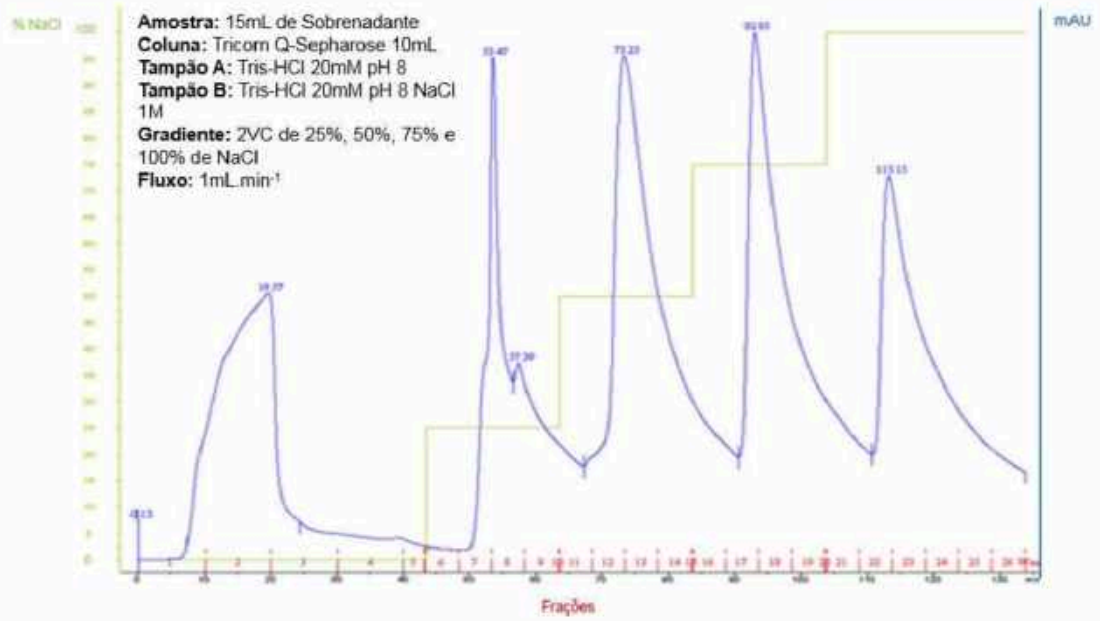
A partir das observações citadas, o quarto dia foi o selecionado para a realização das seguintes etapas com o intuído de separar as proteínas de interesse, para isso o cultivo foi então interrompido no dia escolhido e o sobrenadante clarificado.

Para a clarificação, a amostra foi centrifugada e passou por um processo de filtração para a retenção de partículas maiores que os poros das membranas utilizadas (SAXENA et al., 2009).

Feita a clarificação do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp., foi necessária a realização da concentração do volume de amostra obtido para dar-se sequência aos experimentos; para tal, foram realizados testes para a avaliação da melhor maneira de concentrar a amostra (BURGESS, 2009) (dados no anexo VI). Nesse sentido, foram analisados os valores de atividade de volumes iguais de amostras submetidos a quatro métodos diferentes de concentração de proteínas (precipitação com solvente orgânico, precipitação com sal inorgânico (para fracionamento da amostra), concentração em speed vacum e liofilização), de modo que a liofilização foi selecionada por ser aquela que apresentou melhor custo-benefício (quantidade e proteína, atividade enzimática, tempo e disponibilidade para a realização) para o prosseguimento do estudo.

A amostra obtida após a liofilização de 250mL do sobrenadante do *Pestalotiopsis* sp. foi solubilizada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8 para a realização da cromatografia de troca iônica, na qual as proteínas foram separadas de acordo com a sua polaridade. Na figura 23 é representado o perfil cromatográfico do sobrenadante usado no estudo.

Figura 23: Cromatograma da purificação feita em resina de troca iônica catiônica Q-Sepharose (10mL).



Cromatograma da purificação feita em resina de troca iônica catiônica QSepharose (10mL), em que: o eixo x representa os tubos coletados na cromatografia, o eixo y e linha azul as proteínas lidas à 280nm na unidade de mAU, e a linha verde o gradiente de concentração escalonada de NaCl na eluição. Foram usadas como solução de equilíbrio e eluição, respectivamente, os tampões A (Tris-HCl 20mM pH 8) e B (Tris-HCl 20mM pH 8 NaCl 1M). Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

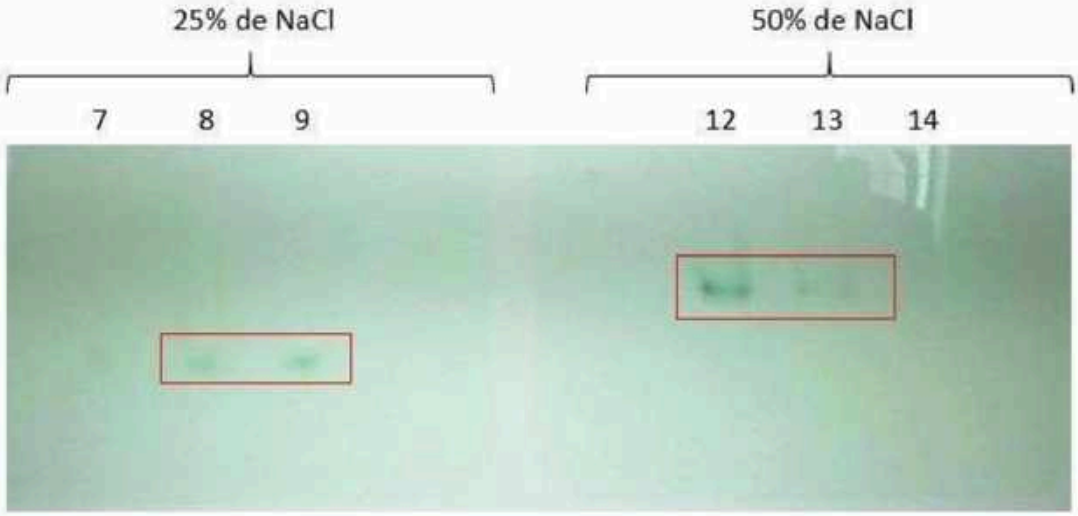
Visto que houve a eluição de proteínas em todas as concentrações do escalonamento com tampão B, foi feita a análise da atividade enzimática de lacases em cada um dos picos coletados (dados presentes no anexo VII), assim como do não retido, para a confirmação de que a enzima de interesse já detectada no ensaios preliminares com a cultura não estava sendo eluída durante o procedimento de lavagem inicial da coluna com tampão A.

Os picos 3 (não retido), 7,8,9 (fração 25% de NaCl), 12,13,14 (fração 50% de NaCl), 17,18,19 (fração 75% de NaCl), 23, 24 e 25 (fração 100% de NaCl) foram separados e testados para a avaliação da atividade de lacases. Esses ensaios apontaram uma maior atividade de Lac nos eluídos com 25% e 50% de NaCl (dados em

anexo), sendo essas frações selecionadas, dialisadas e aliquotadas para análise enzimática em gel não desnaturante (Figura 24).

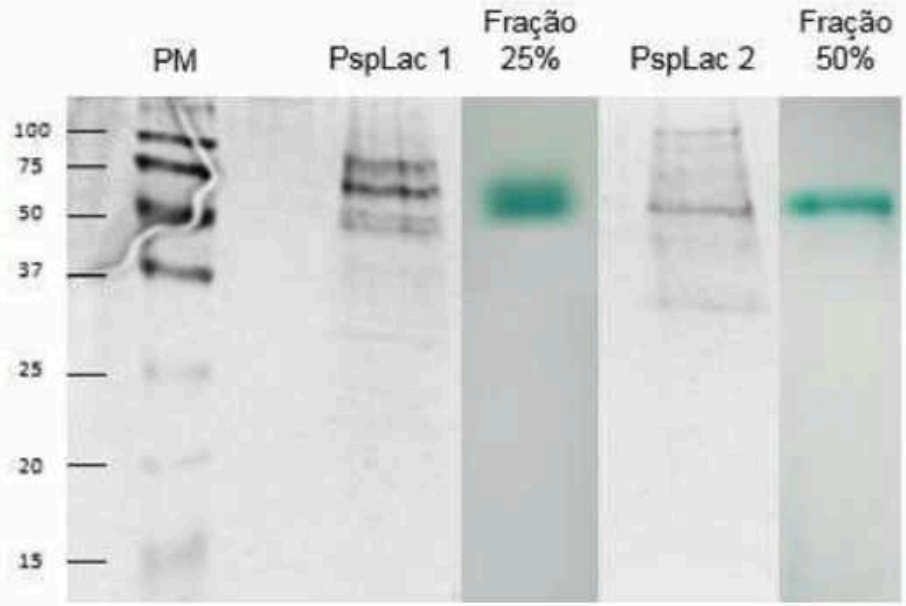
No zimograma, representado na figura 24, feito em condições iguais para as duas amostras, foi possível notar o aparecimento de duas bandas de tamanho distintos nos picos de origem das frações eluídas a 25% e 50%, indicando, assim, a presença de lacases diferentes. No entanto, para a confirmação da existência de duas enzimas foi realizado um gel de poliacrilamida desnaturante, no qual a junção dos picos recuperados na fração 25% de NaCl (7,8 e 9, denominados PspLac1) e fração 50% de NaCl (12,13 e 14, denominados PspLac2) da cromatografia foram aplicadas e analisadas na eletroforese desnaturante (Figura 25).

Figura 24: Zimograma para detecção de lacases (ABTS 2mM) em gel 10% de bis-poliacrilamida.



Zimograma para detecção de lacases (ABTS 2mM) em gel 10% de bis-poliacrilamida com os picos da cromatografia de troca iônica dialisados 7, 8, 9 (eluídos a 25% de tampão B), 12, 13 e 14 (eluidos a 50% de tampão B) em destaque. Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

Figura 25: Eletroforese-SDS e zimograma com PspLac1 (aproximadamente 66,7 kDa), fração 25%, PspLac2 (aproximadamente 56,3 kDa) e fração 50% corada em solução de nitrato de prata e ABTS 2mM.



PM= Marcador de peso molecular (kDa); **PspLac1** = Lacase isolada de *Pestalotiopsis* sp. em 25% de NaCl por cromatografia de troca iônica; **Fração 25% =** Picos obtidos na eluição a 25% de NaCl; **PspLac2** = Lacase isolada de *Pestalotiopsis* sp. em 50% de NaCl por cromatografia de troca iônica; **Fração 50%** = Picos obtidos na eluição a 50% de NaCl. Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

A coloração com nitrato de prata permitiu a vizualização das bandas proteícas. Na figura 25 estão comparados os dois geis de eletroforese (IYER e CHATTOO, 2003; ROSCONI et al., 2005), indicando a existência de uma única lacase para cada uma das frações selecionadas, pois há a presença de uma banda no zimograma para cada fração e perfils diferentes de bandas em cada uma das amostras aplicadas na eletroforese-SDS.

4.4 Caracterização das lacases PspLac1 e PspLac2

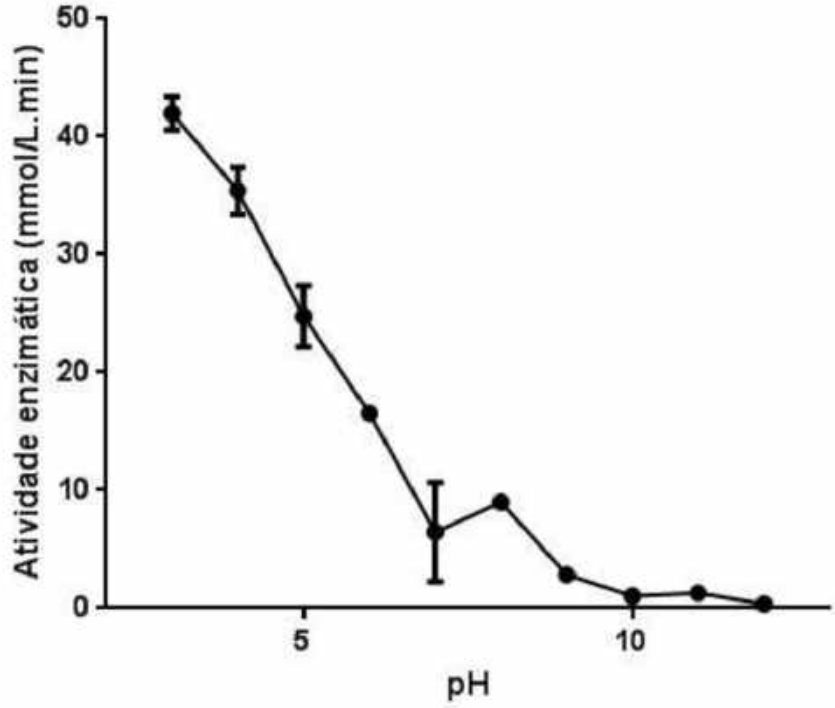
Durante o estudo foi possível o isolamento de duas lacases do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp., PspLac1 eluída na concentração de 25 mM de NaCl e PspLac2 eluída na concentração 50 mM de NaCl. Essas enzimas apresentaram massa

molecular aproximada de 66,7 kDa (PspLac1) e 56,3 kDa (PspLac2), sendo a massa dessas proteínas próximo ao valor observado em outras lacases de fungos como *Steccherinum ochraceum* com lacases que variaram de 75-55 kDa (GLAZUNOVA et al., 2019), *Coriolopsis rígida* 50-80 kDa (SAPARRAT et al., 2002), *Lentinus strigosus* 1566 59-65 kDa (KOLOMYTSEVA et al, 2019), *Trametes versicolor* lccl 67 kDa, *Pleurotus ostreatus* poxa1b 62 kDa (VISWANATH et al., 2014), *Physisporinus rivulosus* 66-68 kDa (HAKALA et al, 2005) e *Pestalotiopsis* sp. 62-63 kDa (WIKEE et al., 2019). A variação de massa entre 80-50 kDa nas Lac de fungo é comum (BALDRIAN, 2005; CHEN et al., 2019) existindo poucos casos na literatura de enzima com massa molecular abaixo de 50 kDa (SAHAY et al, 2019; ASLAM et al, 2016).

Feito o isolamento de PspLac1 e PspLac2, foi então realizada a etapa de caracterização dos parâmetros cinéticos-enzimáticos dessas proteínas; para tanto, foram efetuados ensaios para a saturação total dos sítios ativos da enzima a partir do aumento da concentração de ABTS (0,5 a 50 mM) a fim de se realizar a obtenção dos valores de velocidade máxima (Vmax) e Km, além do kcat, dado que leva à possibilidade da avaliação da eficiência catalítica da enzima através da divisão do kcat/Km. Também foi feita a verificação do pH ótimo das enzimas e a estabilidade térmica em incubação de duas horas, utilizando-se para todos os ensaios a concentração de 0,05 mg/mL de cada proteína (dados para a plotagem dos gráficos no anexo III e IV).

No estudo, a PspLac1 apresentou maiores valores de atividade enzimática quando em pH ácido (Figura 26), com o valor máximo mensurado de 41,99 U/L no pH 3, seguido de 35,39 U/L e 24,76 U/L, respectivamente, nos pHs 4 e 5. A PspLac2 também apresentou maior reatividade em pH ácido, porém o pH 4 foi aquele no qual a enzima apresentou maior valor de atividade, 16,9 U/L, seguido de 15,74 U/L e 12,19 U/L, nos pHs 5 e 3, respectivamente (Figura 27).

Figura 26: Curva de pH ótimo da enzima PspLac1 considerando a variação de pH de 3-12 de PBA 20mM.

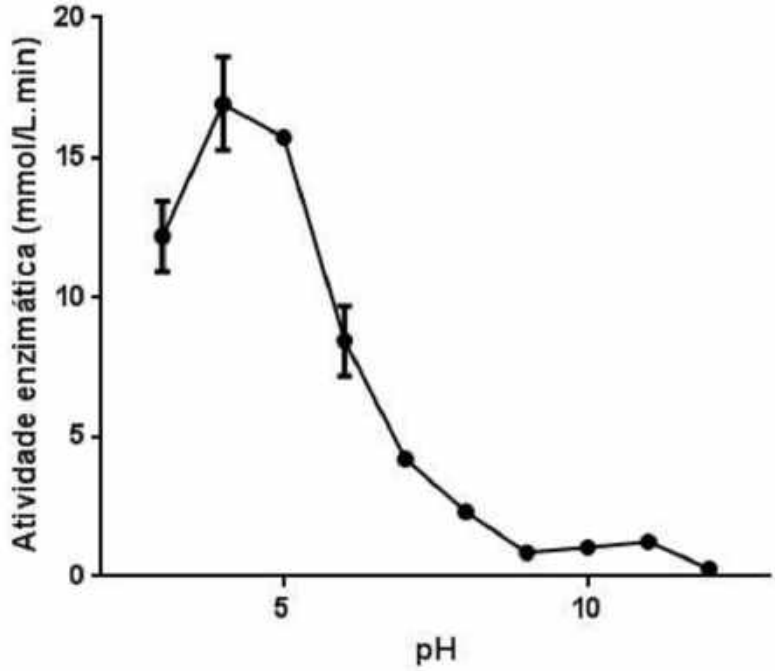


Valores de atividade em U/L dos pontos de pH 3 (41,99 ± 1,4), 4 (35,39 ± 2), 5 (24,76 ± 2,6), 6 (16,55 ± 0,04), 7 (6,45 ± 4,21), 8 (9 ± 0,20), 9 (2,82 ± 0,08), 10 (1,04), 11 (1,27 ± 0,04) e 12 (0,35). Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

A preferência por pHs ácidos por essas enzimas é uma caracteristica marcante de lacases de origem fúngica. Baldrian (2005) apresentou uma tabela na qual compara dados de várias Lac de fungos já descritas na literatura, dentre as informação trazidas estão os pHs ótimos dessas enzimas para o substrato ABTS, com esses variando em uma faixa de 2 – 5 para cada organismo, podendo ser citados o *Trametes versicolor* (pH 2,5), *Lentinula edodes Lcc1* (pH 4) e *Agaricus blazei* (pH 2), como algumas das cepas comparadas nesse trabalho. Já em 2019, a Lac isolada do *Pestalotiopsis* CDBT-F-G1 apresentou pH ótimo igual a 6 (YADAV et al., 2019), enquanto *Pestalotiopsis* sp. J63 mostrou preferência pelo pH 5 para a produção de lacases (CHEN et al., 2011),

mostrando que PspLac1 e PspLac2 possuem faixas de pH ótimo próximas ao esperado na literatura para lacases fúngicas.

Figura 27: Curva de pH ótimo da enzima PspLac2 considerando a variação de pH de 3-12 de PBA 20mM.



Valores de atividade em U/L dos pontos de pH 3 (12,19 ± 1,26), 4 (16,94 ± 1,65), 5 (15,74 ± 0,1), 6 (8,44 ± 1,24), 7 (4,21 ± 0,21), 8 (2,31 ± 0,14), 9 (0,86 ± 0,04), 10 (1,04), 11 (1,25) e 12 (0,27). Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

Sabe-se a importância do pH para a deslignificação da biomassa vegetal, dado que a hidrofobicidade da lignina é um dos motivos que dificulta o acesso à celulose e obtenção de açúcares solúveis. Na produção de bioetanol 2G isso não é diferente, uma vez que a montagem de coquetéis enzimáticos hoje preza por manter um valor de pH que permita a recuperação de açúcares com maior eficiência, sendo muitas vezes considerado o aumento da acidez da solução para auxiliar a modificação da lignina, permitindo a sacarificação da celulose e hemicelulose (LAN et al., 2013). Em

estudo com coquetéis comerciais (celluclast 1,5L suplementada com β-glicosidade 188 *Novozyme*), foi feita a variação do pH de 4-7 da solução tampão adicionada, observando-se que as maiores concentrações de glicose foram obtidas no pH que variou entre 5-6, com o pH 5 consistindo naquele em que houve a maior liberação de glicose (LAN et al., 2013).

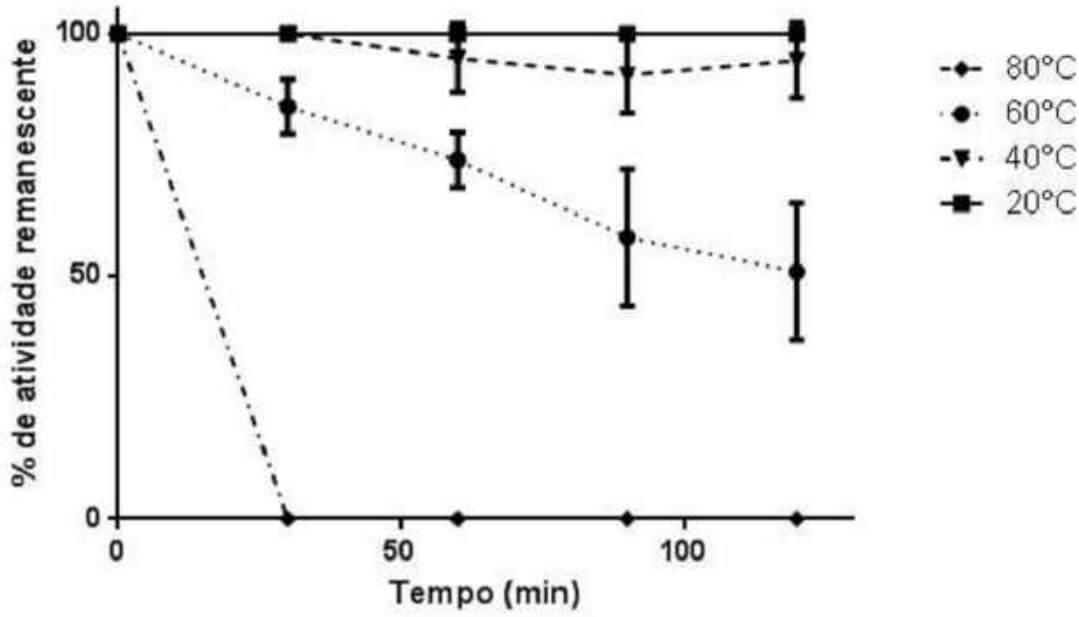
Os coquetéis atualmente fabricados normalmente também apontam para uma faixa de pH entre 4-5 (CHYLENSKI et al., 2017). Contreras e colaboradores publicaram em 2020 um artigo tratando da modificação de enzimas para ampliação da estabilidade em pH (4-10) e temperatura para a construção de coquetéis lignocelulolíticos, sendo grande parte das enzimas envolvidas com a degradação de lignocelulose limitadas a atividade em pHs ácidos e temperatura próxima a 50°C (CONTRERAS et al., 2020; ROCHA-MARTÍN et al., 2017; LIU et al., 2013). Em um trabalho de 2017, foi apontando o pH 6 e 50°C como melhores condições de uma mistura de enzimas para sacarificação (KIM et al., 2017), enquanto a variação de 4-6 de pH foi aquela com melhores resultados de degradação da biomassa pelo coquetel de enzimas do *Aspergillus tubingensis* (PRAJAPAT et al., 2020) para a produção de bioetanol 2G, também sendo visto na clivagem de bagaço da cana-de-açúcar por βxilosidase de *A. niger* ADH-11 e celulase MAPs 450 (enzima comercial) o pH 4,8 (PATEL et al., 2017).

Portanto, é nítida a preferência de faixas de pHs mais ácidas na montagem de coquetéis para degradação de lignocelulose; havendo alguma variação a depender das enzimas utilizadas e do percentual de lignina presente na parede celular da planta que está sendo tratada, uma vez que a quantidade de lignina no tecido está diretamente associada à atividade de oxidorredutases e do pH ácido para a promoção da deslignificação (LIU et al., 2017).

Quanto à estabilidade térmica das enzimas isoladas, a PspLac1 se mostrou estável e com pouca alteração no percentual de atividade relativa durante duas horas entre as temperaturas de 20°C e 40°C; no entanto, com uma hora e meia a 60°C já foi possível notar uma queda próxima a 50% da atividade da PspLac1, sendo a proteína inativa quando incubada a 80°C (Figura 28). Assim como a PspLac1, a PspLac2 foi inativa na incubação de 80°C e, passado trinta minutos de incubação a 60°C, houve

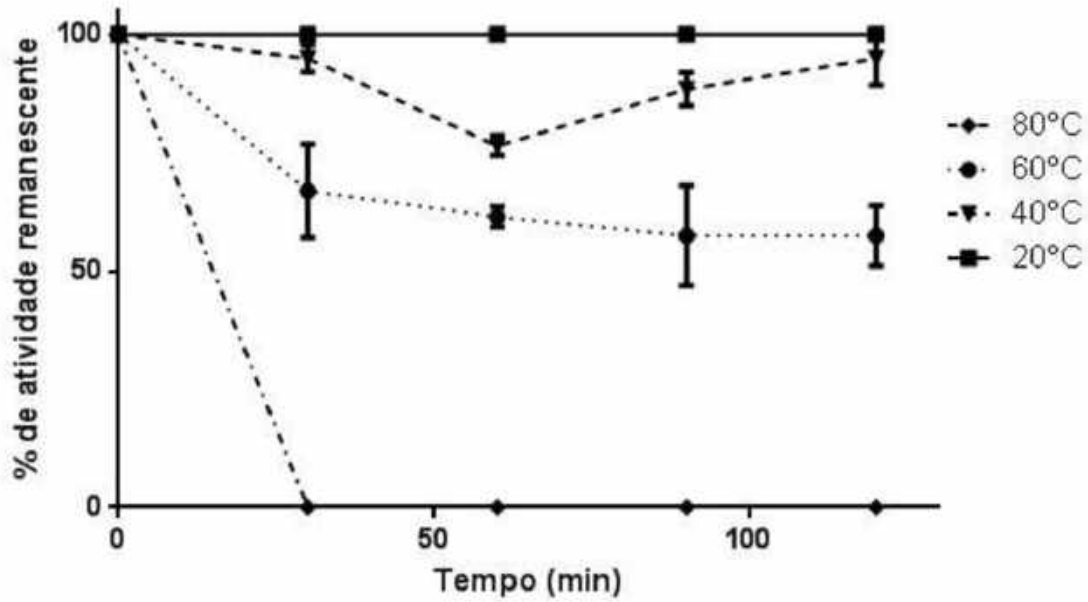
uma queda da atividade dessa enzima chegando ao próximo de 50% e permanecendo assim até o final da incubação (2 horas); já na incubação a 40°C a proteína ficou relativamente constante quanto à atividade, somente apresentando uma queda de aproximadamente 25% com uma hora de incubação, exibindo, assim, um perfil de termoestabilidade próximo ao da PspLac1 (Figura 29).

Figura 28: Curva de estabilidade térmica da enzima PspLac1 considerando o percentual da atividade remascente da enzima.



Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

Figura 29: Curva de estabilidade térmica da enzima PspLac2 considerando o percentual da atividade remanescente da enzima.



Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

As lacases isoladas de *Lentinus strigosus* 1566 revelaram um perfil diferente do visto na PspLac1 e PspLac2, estando a faixa de termoestabilidade entre 60-70°C (lacase I e lacase II), enquanto no nosso estudo a faixa das duas enzimas se encontra entre 20-60°C, sendo a perda de 50% da atividade somente notada em temperaturas acima de 60°C e depois de 30 minutos a 1 hora de incubação; contudo, no trabalho com *Lentinus strigosus* 1566 a meia vida das enzimas foi atingida em duas horas de incubação, tempo em que ainda era observada atividade próxima a 50% da PspLac1 e PspLac2 (KOLOMYTSEVA et al., 2019). Já a Lac de *Trametes versicolor* apresentou valores mais próximos aos do estudo, sendo estável entre 35-55°C (LITWIŃSKA et al., 2019), assim como verificou-se em relação à Lac de *Pestalotiopsis* CDBT-F-G1, que teve uma variação entre 30-50°C, ocorrendo a queda de 50% da atividade com 30 minutos a 60°C, perfil semelhante ao visto na PspLac2 (YADAV et al., 2019). A temperatura ótima dessa classe de enzimas costuma variar entre 30 e 60°C (LI et al., 2020), contudo são poucos os trabalhos que abordam a estabilidade térmica dessas proteínas (KOLOMYTSEVA et al., 2019).

Tabela 4: Dados de pH e temperatura de lacases fúngicas.

Organismo	pH ótimo	Temperatura (°C)	Referência
Trametes versicolor	2,5	55	ROGALSKI et al., 1990; HÖFER e SCHLOSSER, 1999
***Sclerotium rolfsii* RSL1**	2,4	65	RYAN et al., 2003
Volvariella volvacea	4	70	CHEN et al., 2004
Daedalea quercina	2,5	60-70	BALDRIAN, 2004
***Pleurotus ostreatus* POXA1, POXA2 e POXC**	3	n.d	VISWANATH et al., 2014
Trametes ljubarskyi	3-4	66-70	KUMAR et al., 2019
***Lentinus strigosus* 1566**	2,3-2,4	60-70	KOLOMYTSEVA et al., 2019
Pestalotiopsis sp.	4-6	50	WIKEE et al., 2019
***Pestalotiopsis* CDBT-FG1**	6	60	YADAV et al., 2019
***Pestalotiopsis sp.* (BBF-245)**	3-4	20-60	O estudo

Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

*n.d = não determinado;

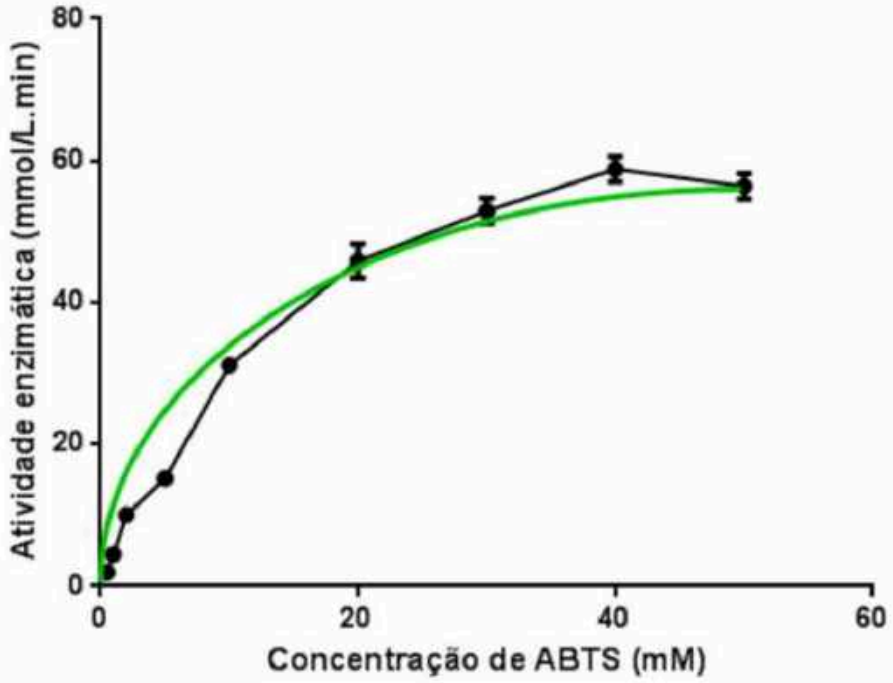
*Determinados utilizando como substrato ABTS.

Quanto à análise do perfil catalítico das enzimas isoladas, notou-se que ambas seguem as características de uma enzima michaeliana, formando uma curva hiperbólica na qual há a formação de uma plato com a saturação da capacidade dos sitios ativos e o aumento da concentração de susbtrato, em que: a velocidade máxima

(Vmax) representa a maior velocidade quando todos os sítios estão ocupados, Km a afinidade da enzima pelo substrato que está sendo usado no ensaio, kcat número de renovação e kcat x Km^{-1} a constante de especificidade.

Conhecendo esses parâmetros, foi realizada a avaliação das características cinéticas da PspLac1 (Figura 30) e PspLac2 (Figura 31). A PspLac1 apresentou um Km de 15,72 mM, Vmax de 78,81 mmol/L.min e kcat de 18 x 10^2 s^{-1}, para o substrato ABTS calculados no programa GraphPad Prism 4. A constante de especificidade para essa enzima foi de 1,14 x 10^2 s^{-1} mM^{-1}, enquanto para a PspLac2 o seu Km foi de 6,42 mM, Vmax de 24,01 mmol/L.min e kcat 5 x 10^2 s^{-1}, sendo a razão entre o seu kcat e Km igual a 7,7 x 10 s^{-1} mM^{-1}.

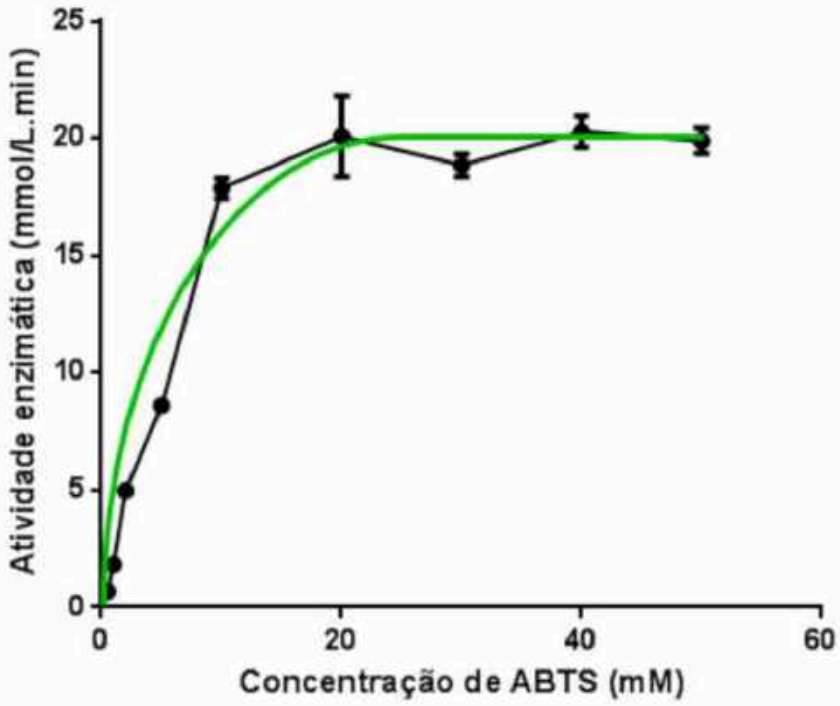
Figura 30: Atividade da PspLac1 em concentrações crescentes de substrato (ABTS) apresentando um perfil de curva hiperbólica característicos de enzimas michaelianas.



Valores de atividade em U/L dos pontos de cada concentração (mM) de ABTS usada no ensaio de cinética-enzimática 0,5 (1,95 ± 0,11), 1 (4,47 ± 0,03), 2 (10,04 ± 0,31), 5 (15,18 ± 0,49), 10 (31,15 ± 0,78), 20 (45,85 ± 2,43), 30 (52,92 ± 1,74), 40 (58,79 ±n1,76) e 50 (56,39 ± 1,78). Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

Comparando os dados obtidos da cinética de PspLac1 e PspLac2 com outros fungos, observa-se que as enzimas isoladas apresentaram valores de Km maiores do que outras lacases já descritas de *Pestalotiopsis*, como *Pestalotiopsis* CDBT- F-G1 0,10 mM (YADAV et al., 2019), PsLac 1 0,024 mM e PsLac 2 0,1 mM de *Pestalotiopsis* sp. (WIKEE et al, 2019), e também de outros fungos descritos na literatura, sendo a afinidade por ABTS menor do que as Lac conhecidas. Na tabela 5 estão representados os valores comparativos de Km, kcat e kDa de algumas lacases já isoladas.

Figura 31: Atividade da PspLac2 em concentrações crescentes de substrato (ABTS) apresentando um perfil de curva hiperbólica característicos de enzimas michaelianas.



Valores de atividade em U/L dos pontos de cada concentração (mM) de ABTS usada no ensaio de cinética-enzimática 0,5 (0,67 ± 0,05), 1 (1,83 ± 0,12), 2 (4,97 ± 0,13), 5 (8,61 ± 0,12), 10 (17,86 ± 0,43), 20 (20,08 ± 1,71), 30 (18,85 ± 0,48), 40 (20,27 ± 0,67) e 50 (19,88 ± 0,54). Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

No entanto, as enzimas desse ensaio apresentaram valores de kcat maiores que o visto em r-CclL (SCHNEIDER et al., 1999), PsLac1, PsLac2 (WIKEE et al., 2019), entre as outras enzimas comparadas na tabela 5; somente apresentando valores menores que a Lacase de *Tricholoma giganteum* AGDR1 (PspLac1 e PspLac2) (RUDAKIYA et al., 2020) e Lacase de *Coriolus zonatus* (PspLac2) (KOROLJOVA et al, 1999). A importância de ter um alto kcat é ligada à eficiência de clivagem do substrato e à constante de especificidade dessa enzima. Conforme citado acima, o valor da constante de especificidade de PspLac1 e PspLac2 foi de $1,14 \times 10^2$ s^{-1} mM^{-1} e $7,7 \times 10$ s^{-1} mM^{-1}, respectivamente, sendo a sua eficiência catalítica maior

que a de rLac (2,5 s^{-1} mM^{-1}) (WANG et al., 2019), PsLac 2 (4,3 s^{-1} mM^{-1}) e PsLac 1 (2,9 x 10 s^{-1} mM^{-1}) (WIKEE et al., 2019) e inferior a So3120 (1,8 x 10^3 s^{-1} mM^{-1}) e So3174 (2,9 x 10^3 s^{-1} mM^{-1}) (GLAZUNOVA et al., 2019) quando comparado com as demais proteínas descritas na tabela 5. Com isso foi possível observar que, apesar da PspLac2 ter apresentado uma maior afinidade pelo ABTS, a PspLac1 foi – dentre as duas – a mais eficiente na degradação desse substrato.

Tabela 5: Caracterização de enzimas lacases de diferentes organismos.

Lacase	Massa molecular (kDa)	Km (mM)	kcat (s^{-1})	kcat/Km (s^{-1}. mM^{-1})	Organismo	Referência
Lacase	74	0,1	n.d	n.d	*Coniothyrium minitans*	DAHIYA, J, S et al., 1998
r-CclL	58	0,023	18,16	$7,8x10^2$	*Coprinus cinereus*	SCHNEIDER, P et al., 1999
Lacase	60	0,007	624	$8,9x10^4$	*Coriolus zonatus*	KOROLJOVA, O, V et al, 1999
LacI	66	0,012	77	$6,4x10^3$	*Coriolopsis rigida*	SAPARRAT, M, C, N et al., 2002
LacII	66	0,011	78	$7x10^3$	*Coriolopsis rigida*	SAPARRAT, M, C, N et al., 2002
LACC6	n.d	0,47	n.d	n.d	*Pleurotus ostreatus*	LETTERA, V et al., 2010
Lacase	75	3,03	n.d	n.d	*Marasmius* BBKAV79	VANTAMURI e KALIWAL, 2016
rLac	58	1,9	4,8	2,5	*Bacillus amyloliquefaciens* TCCC 111018	WANG, H et al., 2019
Lac1	71	0,29	n.d	n.d	*Trametes polyzona* KU-RNW027	LUEANGJAROENKIT, P et al., 2019
PsLac1	63	0,024	0,696	29	*Pestalotiopsis* sp.	WIKEE, S et al., 2019
PsLac2	62	0,10	0,431	4,3	*Pestalotiopsis* sp.	WIKEE, S et al., 2019
So3120	72-55	0,175	325	$1,8x10^3$	*Steccherinum ochraceum*	GLAZUNOVA, O et al., 2019
So3174	72-55	0,081	240	$2,9x10^3$	*Steccherinum ochraceum*	GLAZUNOVA, O et al., 2019
Lacase	41	1,143	$2,27x10^6$	$1,9x10^6$	*Tricholoma giganteum* AGDR1	RUDAKIYA, D et al., 2020
PspLac1	66,73	15,72	18×10^2	$1,4x10^2$	*Pestalotiopsis* sp. BBF245	O estudo
PspLac2	56,28	6,42	5×10^2	7,7x10	*Pestalotiopsis* sp. BBF245	O estudo

Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

*n.d = não determinado;

*Determinados utilizando como substrato ABTS.

5. CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento desse trabalho foi possível concluir que a cepa BBF-245, identificada como *Pestalotiopsis* sp., foi capaz de secretar enzimas oxidorredutases, principalmente lacases, no seu sobrenadante quando cultivada em meio com 1% de bagaço da cana-de-açúcar. Em virtude disso foram isoladas e caracterizadas duas lacases nativas do *Pestalotiopsis* sp. com potencial na degradação da biomassa vegetal.

Desse modo, pode-se concluir que:

- A cepa BBF-245 foi identificada como *Pestalotiopsis* sp., tanto por taxonomia clássica como por avaliação molecular. Dado a proximidade e sobreposição das espécies do gênero, não foi possível determinar-se a espécie, podendo o BBF-245 ser um novo *Pestalotiopsis* ainda não descrito.
- Foi determinada condição de cultivo em meio MBC com 1% de bagaço da cana-de-açúcar sem indutores durante dez dias a 150 rpm/28°C, no qual observou-se a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pestalotiopsis* sp. (Lac, LiP e MnP) com a produção de lacases mais expressiva do que as outras oxidorredutases analisadas;
- Foi possível a purificação de duas lacases PspLac1 e PspLac2 do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp.;
- Foi calculado o pH ótimo e termoestalidade para cada uma das proteínas isoladas, sendo ambas com pH ótimo ácido e termoestável em uma mesma faixa de temperatura (Tabela 6);
- Foram calculados os parâmetros cinético-enzimáticos para PspLac1 e PspLac2 (Tabela 6), constituindo-se a PspLac2 na enzima com maior afinidade pelo ABTS dentre as duas. Os dados obtidos apontaram para uma menor afinidade por ABTS do que algumas das lacases fúngicas descritas na literatura;
- Foram calculadas as constantes de especificidade para PspLac1 e PspLac2, na qual pode-se observar que PspLac1, apesar de apresentar menor afinidade

pelo ABTS, foi a enzima no estudo que apresentou maior eficiência catalítica (Tabela 6).

Tabela 6: Caracterização das lacases de *Pestalotiopsis* sp. (BBF-245).

	PspLac1	**PspLac2**
Purificação	Q-Sepharose eluição em 25mM de NaCl	Q-Sepharose eluição em 50mM de NaCl
Massa molecular aproximada (kDa)	66,7	56,3
pH ótimo	3	4
Termoestabilidade (°C)	20-60	20-60
Km (mM)	15,72	6,42
kcat (s^{-1})	18 x 10^{2}	5 x 10^{2}
kcat/Km ($s^{-1}mM^{-1}$)	1,14 x 10^{2}	7,7 x 10

Fonte: Daniela De Lucena Pedroso, 2020.

Logo, esse trabalho atingiu todos os objetivos pretendidos durante o seu desenvolvimento, caracterizando um novo possível organismo para a otimização da degradação de biomassa lignocelulósica e isolando duas lacases que podem auxiliar a deslignificação do bagaço da cana-de-açúcar e, futuramente, ajudar na potencialização de coquetéis lignocelulósicos para produção de bioetanol de segunda geração e em outras possíveis aplicações biotecnológicas.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras, a partir dos resultados obtidos durante o desenvolvimento da dissertação "Enzimas Oxidorredutases do Fungo *Pestalotiopsis* sp.", propõe-se a execução de testes de novas condições de cultivo para propiciar o aumento da produção enzimática por BBF-245; a realização de novas análises moleculares com diferentes oligonucleotídeos para confirmação da espécie ou caracterização do BBF-245 como um novo representante de *Pestalotiopsis*; a avaliação do potencial das enzimas isoladas no preparo de coquetéis enzimáticos com outras enzimas ou soluções já utilizadas na degradação do bagaço da cana-deaçúcar; e, por fim, o teste do potencial de sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar com o sobrenadante do estudo sozinho e em misturas com outros fungos e/ou bactérias que apresentem capacidade de degradação desse tipo de biomassa.

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A., & FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

ALCALDE, M. (2007). **Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In Industrial enzymes** (pp. 461-476). Springer, Dordrecht.

ALFENORE, S.; MOLINA-JOUVE, C. Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1747-1756, 2016.

ALISSON, 2017 <http://agencia.fapesp.br/etanol-de-segunda-geracao-poderasereconomicamente-viavel-a-partir-de-2025/26272/> acesso em outubro de 2018.

ANWAR, Z., GULFRAZ, M., & IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of radiation research and applied sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.

ARA, T.; MONZUR, S.; SAAND, M. A.; ISLAM, R.; ALAM, S.; HOSSAIN, M. The first report of Pestalofiopsis sp. causing crown rot disease on strawberry (Fragaria× ananassa Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity. **International Journal of Biosciences**, v. 11, n. 4, p. 350-358, 2017.

AREVALO-GALLEGOS, A., AHMAD, Z., ASGHER, M., PARRA-SALDIVAR, R., & IQBAL, H. M. Lignocellulose: a sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—a review. **International journal of biological macromolecules**, *99*, 308-318. (2017).

ARFI, Y., CHEVRET, D., HENRISSAT, B., BERRIN, J. G., LEVASSEUR, A., & RECORD, E. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus Pestalotiopsis sp. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2013.

ARORA, D. S., & SHARMA, R. K. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1760-1788, 2010.

ASLAM, M. S., HANIF, K., REHMAN, S. U., GULL, I., ATHAR, M. A., & ABBAS, Z. Delignification of paper pulp by purified laccase from Aspergillus flavus. **J Anim Plant Sci**, v. 26, p. 1399-1404, 2016.

AZLAN, A. M. N.; AHMAD, Z. A. M.; IDRIS, A. S.; VADAMALAI, G. Assessment of Leaf Spot and Anthracnose Diseases in Nurseries and It Relationship with Oil Palm Seedling Ages. **Int. J. Adv. Multidiscip**, v. 5, n. 1, p. 19-26, 2018.

BALDRIAN, P. Fungal laccases–occurrence and properties. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.

BALDRIAN, P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus Daedalea quercina and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 560-563, 2004.

BHALLA, A., BANSAL, N., KUMAR, S., BISCHOFF, K. M., & SANI, R. K.. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource technology**, v. 128, p. 751-759, 2013.

BHARDWAJ, H., GUPTA, R., & TIWARI, A. Communities of microbial enzymes associated with biodegradation of plastics. **Journal of Polymers and the Environment**, v. *21*, n. 2, p. 575-579, 2013.

BHATTACHARYA, A., & PLETSCHKE, B. I. Strategic optimization of xylanase–mannanase combi-CLEAs for synergistic and efficient hydrolysis of complex lignocellulosic substrates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 140-150, 2015.

BILAL, M., ASGHER, M., IQBAL, H. M., HU, H., & ZHANG, X. Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products—a review. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 447-458, 2017.

BISSARO, B., VARNAI, A., RØHR, Å. K., & EIJSINK, V. G. Oxidoreductases and reactive oxygen species in conversion of lignocellulosic biomass. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 82, n. 4, p. 29-18, 2018.

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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUSWELL, J. A., CAI, Y. J., CHANG, S. T., PEBERDY, J. F., FU, S. Y., & YU, H. S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 537-542, 1996.

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

CARDONA, C. A., & SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CARVALHO, G. G. P. D., PIRES, A. J. V., VELOSO, C. M., MAGALHÃES, A. F., FREIRE, M. A. L., SILVA, F. F. D., ... & CARVALHO, B. M. A. D. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 125-132, 2006.

CHAUHAN, P. S., & GUPTA, N. Insight into microbial mannosidases: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 190-201, 2017.

CHEN, H. Y., XUE, D. S., FENG, X. Y., & YAO, S. J. Screening and production of ligninolytic enzyme by a marine-derived fungal Pestalotiopsis sp. J63. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 165, n. 7-8, p. 1754-1769, 2011.

CHEN, M., WAIGI, M. G., LI, S., SUN, K., & SI, Y. Fungal laccase-mediated humification of estrogens in aquatic ecosystems. **Water research**, p. 115040, 2019.

CHEN, S., GE, W., & BUSWELL, J. A. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, Volvariella volvacea. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 2, p. 318-328, 2004.

CHYLENSKI, P., FORSBERG, Z., STÅHLBERG, J., VÁRNAI, A., LERSCH, M., BENGTSSON, O., ... & EIJSINK, V. G. Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. **Journal of biotechnology**, v. *246*, p. 16-23, 2017.

CLAUS, H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Archives of microbiology**, v. 179, n. 3, p. 145-150, 2003.

COLLINS, P. J; DOBSON, A. D.; FIELD, J. A. Reduction of the 2,2'-Azinobis(3Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. **Applied and environmental Microbiology**, v. 64, p. 2026-2031, 1998.

CONTRERAS, F., PRAMANIK, S., ROZHKOVA, A. M., ZOROV, I. N., KOROTKOVA, O., SINITSYN, A. P., ... & DAVARI, M. D. Engineering Robust Cellulases for Tailored Lignocellulosic Degradation Cocktails. **International Journal of Molecular Sciences**, v. *21*, n. 5, p. 1589, 2020.

CORRÊA, R. C. G., RHODEN, S. A., MOTA, T. R., AZEVEDO, J. L., PAMPHILE, J. A., DE SOUZA, C. G. M., ... & PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

COUTO, S. R., & HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006.

COVERT, T.; GREENSTONE, M.; KNITTEL, C. R. Will we ever stop using fossil fuels?. **Journal of Economic Perspectives**, v. 30, n. 1, p. 117-38, 2016.

DAHIYA, J. S., SINGH, D., & NIGAM, P. Characterisation of laccase produced by Coniothyrium minitans. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 38, n. 5 6, p. 349-359, 1998.

DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., SYED, T. A., & QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 1, n. 1, p. 36. 2010.

DE ARAGÃO PEDROSO, L. L., DA SILVA, F. F., DA SILVA, F. F., MELO, Á. M., JUNIOR, M. E., SHIMOYA, A., ... & DE SOUZA, C. L. M. Demandas atuais e futuras da biomassa e da energia renovável no Brasil e no mundo/Current and future demands for biomass and renewable energy in Brazil and worldwide. **Brazilian Journal of Development**, v. 4, n. 5, p. 1980-1996, 2018.

DE CASSIA PEREIRA, J., TRAVAINI, R., MARQUES, N. P., BOLADO-RODRÍGUEZ,

S., & MARTINS, D. A. B. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from Myceliophthora thermophila JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource technology**, v. 204, p. 122-129, 2016.

DE MIRANDA, R. L.; MARTINS, E. M.; LOPES, K.. A potencialidade energética da biomassa no Brasil. **Desenvolvimento Socioeconômico em Debate**, v. 5, n. 1, p. 94106, 2019.

DE MIRANDA, RONALDO LEÃO; MARTINS, ELIANE MARIA; LOPES, KAMILA. A potencialidade energética da biomassa no Brasil. **Desenvolvimento Socioeconômico em Debate**, v. 5, n. 1, p. 94-106, 2019.

DE SOUZA, A. P., LEITE, D. C., PATTATHIL, S., HAHN, M. G., & BUCKERIDGE, M. S. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564-579, 2013.

DHAR H., KASANA R. C., DUTT S., GULATI A. Cloning and expression of low temperature active endoglucanase EG5C from Paenibacillus sp. IHB B 3084. **Internacional Journal of Biological Macromolecules** , v. 81, p. 259-266, 2015.

DIAS, M. O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D., ROCHA, G. J., PRADELLA, J. G. C., ROSSELL, C. E., ... & BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production?. **Bioresource technology**, v. 102 n. 19, p. 8964-8971, 2011.

DITTMER, N. T., SUDERMAN, R. J., JIANG, H., ZHU, Y. C., GORMAN, M. J., KRAMER, K. J., & KANOST, M. R. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, Manduca sexta, and the malaria mosquito, Anopheles gambiae. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 1, p. 29-41, 2004.

DU J., CUI C. H., PARK S. C., KIM J. K., YU H. S., JIN F. X., SUN C., KIM S. C., IM W. T. Identification and characterization of a ginsenoside -transforming betaglucosidase from Pseudocardia sp, Gsoli 1536 and its application for enhanced production of minor ginsenoside Rg2(S). **PloS one**, v. 9, p. e96914, 2014.

FALADE, A. O., NWODO, U. U., IWERIEBOR, B. C., GREEN, E., MABINYA, L. V., & OKOH, A. I. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **Microbiology Open**, v. 6, n. 1, e00394, 2017.

FERREIRA, L. R. A., OTTO, R. B., SILVA, F. P., DE SOUZA, S. N. M., DE SOUZA, S. S., & JUNIOR, O. A. Review of the energy potential of the residual biomass for the distributed generation in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 440-455, 2018.

FIGUEIREDO, J.; PIMENTEL, I. C.; VICENTE, V. A.; PIE, M. R.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; GLIENKE, C. Bioprospecting highly diverse endophytic Pestalotiopsis spp. With antibacterial properties from Maytenu silicifolia, a medicinal plant from Brazil. **Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1123-1132, 2007.

FOKINA, O., EIPPER, J., WINANDY, L., KERZENMACHER, S., & FISCHER, R. Improving the performance of a biofuel cell cathode with laccase-containing culture supernatant from Pycnoporus sanguineus. **Bioresource technology**, v. 175, p. 445453, 2015.

FOROOTANFAR, H., & FARAMARZI, M. A. Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. **Biotechnology progress**, v. 31, n. 6, p. 1443-1463, 2015.

GARCIA, F. S.. **ENZIMAS OXIDORREDUTASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS**. 2018. 171 f. dissertação (Programa de pósgraduação interunidades em Biotecnologia) - Universidade do Estado de São Paulo, USP, São Paulo.

GARCIA, N. F. L., DA SILVA SANTOS, F. R., BOCCHINI, D. A., DA PAZ, M. F., FONSECA, G. G., & LEITE, R. S. R. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by Lichtheimia ramosa: Potential for sugarcane bagasse saccharification. **Industrial crops and products,** v. 122, p. 49-56, 2018.

GASSARA, F., BRAR, S. K., TYAGI, R. D., VERMA, M., & SURAMPALLI, R. Y. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by Phanerochaete chrysosporium. **Biochemical engineering journal**, v. 49, n. 3, p. 388-394, 2010.

GELLER, H., SCHAEFFER, R., SZKLO, A., & TOLMASQUIM, M. Policies for advancing energy efficiency and renewable energy use in Brazil. **Energy Policy**, v. 32, n. 12 p., 1437-1450, 2004.

GEETHA, K. S., KUMARI, B. S. S., KUMAR, K. D., & NAIK, S. N. K. Influence of organophosphorus pesticides on activities of antioxidant enzymes by Pestalotiopsis microspora TKBRR. **International Journal of Research end Analytical Reviews**, v. 6, n. 1, 2019.

GLAZUNOVA, O. A., MOISEENKO, K. V., KAMENIHINA, I. A., ISAYKINA, T. U., YAROPOLOV, A. I., & FEDOROVA, T. V. Laccases with Variable Properties from Different Strains of Steccherinum ochraceum: Does Glycosylation Matter?. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 2008, 2019.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental research letters**, v. 1, n. 1, p. 014008, 2006.

GUO, H., WANG, X. D., & LEE, D. J. Proteomic researches for lignocellulosedegrading enzymes: A mini-review. **Bioresource technology**, v. 265, p. 532-541, 2018.

HAKALA, T. K., LUNDELL, T., GALKIN, S., MAIJALA, P., KALKKINEN, N., & HATAKKA, A. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus Physisporinus rivulosus grown on spruce wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 461-468, 2005.

HAO, J. J., TIAN, X. J., SONG, F. Q., HE, X. B., ZHANG, Z. J., & ZHANG, P. Involvement of lignocellulolytic enzymes in the decomposition of leaf litter in a subtropical forest. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 193-198, 2006.

HAO, J., SONG, F., HUANG, F., YANG, C., ZHANG, Z., ZHENG, Y., & TIAN, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus Pestalotiopsis sp. and its decolorization of azo dye. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 233, 2007.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, A., FERREIRA, P., & MARTÍNEZ, A. T. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1395-1410, 2012.

HUGO, 2018 <http://revistapesquisa.fapesp.br/2018/04/19/fronteiras-do-etanol-decanade-acucar/> acesso em dezembro de 2018.

HWANG, S; LEE, C. H.; AHN, I. S. Product identification of guaiacol oxidation catalyzed by manganese peroxidase. **Journal of industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, p. 487-492, 2008.

IMMANUEL, G.; BHAGAVATH, C.; IYAPPA, RAJ P. Production and partial purification of cellulase by Aspergillus niger and A. fumigatus fermented in coir waste and sawdust. 2007.

IYER, G., & CHATTOO, B. B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, Magnaporthe grisea. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 1, p. 121126. (2003).

JANUSZ, G., KUCHARZYK, K. H., PAWLIK, A., STASZCZAK, M., & PASZCZYNSKI, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 1, p. 1-12, 2013.

JAYAWARDENA, R. S., ZHANG, W., LIU, M., MAHARACHCHIKUMBURA, S. S., ZHOU, Y., HUANG, J., ... & HYDE, K. D. Identification and characterization of Pestalotiopsis-like fungi related to grapevine diseases in China. **Fungal biology**, v. 119, n. 5, p. 348-361, 2015.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; SIMPSON, J. A.; HODGKISS, J.; HYDE K.D. Phylogenetic significance of morphological characters In the taxonomy of Pestalotiopsis species. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** v. 27, p. 372–383, 2003.

KERSTEN, P. J. Glyoxal oxidase of Phanerochaete chrysosporium: its characterization and activation by lignin peroxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 8, p. 2936-2940, 1990.

KIM, I. J., LEE, H. J., & KIM, K. H. Pure enzyme cocktails tailored for the saccharification of sugarcane bagasse pretreated by using different methods. **Process Biochemistry**, v. *57*, p. 167-174, 2017.

KIM, S. C., KANG, S. H., CHOI, E. Y., HONG, Y. H., BOK, J. D., KIM, J. Y., ... & CHO, K. K. Cloning and characterization of an endoglucanase gene from Actinomyces sp.

Korean native goat 40. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 1, p. 126, 2016.

KOLOMYTSEVA, M. P., MYASOEDOVA, N. M., CHERNYKH, A. M., GAIDINA, A. S., SHEBANOVA, A. D., BASKUNOV, B. P., ... & PINCHUK, I. P. Laccase isoform diversity in basidiomycete Lentinus strigosus 1566: Potential for phenylpropanoid polymerization. **International journal of biological macromolecules**, v. 137, p. 1199-1210, 2019.

KOROLJOVA, O. V., STEPANOVA, E. V., GAVRILOVA, V. P., BINIUKOV, V. I., JAROPOLOV, A. I., VARFOLOMEYEV, S. D., ... & OTTO, A. Laccase of Coriolus zonatus. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 115-127, 1999.

KRUSCHEWSKY, M. C. **TAXONOMIA E ECOLOGIA DO GÊNERO Pestalotiopsis NO BRASIL, COM ÊNFASE PARA A MATA ATLÂNTICA DO SUL DA BAHIA.** 2010. Dissertação em Produção Vegetal. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ.

KÜES, U. (Ed.). (2007). **Wood production, wood technology, and biotechnological impacts**. Universitätsverlag Göttingen.

KUMAR, A., ARORA, S., JAIN, K. K., & SHARMA, K. K. Metabolic coupling in the cocultured fungal-yeast suite of Trametes ljubarskyi and Rhodotorula mucilaginosa leads to hypersecretion of laccase isozymes. **Fungal biology**, v. 123, n. 12, p. 913-926, 2019.

KUMAR, R., SINGH, S., & SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

KUNAMNENI, A., CAMARERO, S., GARCÍA-BURGOS, C., PLOU, F. J., BALLESTEROS, A., & ALCALDE, M. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial cell factories**, v. 7, n. 1, p. 32, 2008.

KURIAN, J. K., NAIR, G. R., HUSSAIN, A., & RAGHAVAN, G. V. Feedstocks, logistics and pre-treatment processes for sustainable lignocellulosic biorefineries: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, p. 205219, 2013.

KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A., & GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracelluar H2O2 dependent oxidases from ligninolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium. **FEBS letters**, v. *169*, n. 2, p. 247-250, 1984.

KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A., & GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracelluar H2O2 dependent oxidases from ligninolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium. **FEBS letters**, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.

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

LAN, T. Q., LOU, H., & ZHU, J. Y. Enzymatic saccharification of lignocelluloses should be conducted at elevated pH 5.2–6.2. **Bioenergy Research**, v. *6*, n. 2, p. 476-485, 2013.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.

LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOSKY, E.; CLARDY, J. C. Torreyani acid: a selectively cytotoxic quinine dimer from the endophytic fungus Pestalotiopsis microspora. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 3232-3233, 1996

LEONTIEVSKY, A., MYASOEDOVA, N., POZDNYAKOVA, N., & GOLOVLEVA, L. Yellow'laccase of Panus tigrinus oxidizes non phenolic substrates without electron transfer mediators. **FEBS letters**, v. 413, n. 3, p. 446-448, 1997.

LETTERA, V., PISCITELLI, A., LEO, G., BIROLO, L., PEZZELLA, C., & SANNIA, G. Identification of a new member of Pleurotus ostreatus laccase family from mature fruiting body. **Fungal biology**, v. 114, n. 9, p. 724-730, 2010.

LEVASSEUR, A., DRULA, E., LOMBARD, V., COUTINHO, P. M., & HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013.

LI, T., HUANG, L., LI, Y., XU, Z., GE, X., ZHANG, Y., ... & LIU, Y. The heterologous expression, characterization, and application of a novel laccase from Bacillus velezensis. **Science of The Total Environment**, p. 136713, 2020. LITWIŃSKA, K., BISCHOFF, F., MATTHES, F., BODE, R., RUTTEN, T., & KUNZE, G. Characterization of recombinant laccase from Trametes versicolor synthesized by Arxula adeninivorans and its application in the degradation of pharmaceuticals. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 102, 2019.

LIU, Y., CHEN, L., XIE, Q., YU, X., DUAN, A., LIN, Y., ... & ZHU, X. A Gene Cluster for the Biosynthesis of Dibenzodioxocinons in the Endophyte Pestalotiopsis microspora, a Taxol Producer. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. *29*, n. 10, p. 15701579, 2019.

LUEANGJAROENKIT, P., TEERAPATSAKUL, C., SAKKA, K., SAKKA, M., KIMURA, T., KUNITAKE, E., & CHITRADON, L. Two manganese peroxidases and a laccase of Trametes polyzona KU-RNW027 with novel properties for dye and pharmaceutical product degradation in redox mediator-free system. **Mycobiology**, v. 47, n. 2, p. 217229, 2019.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., & PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MADHAVI, V., & LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009.

MAEDA R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; DE CASTRO, A. M.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolisis of pretreated

sugar cane bagasse using Penicellium funiculosum and Trichoderma harzianum cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1196-1201, 2011.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N; GUO, L. D.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. Improving the backbone tree for the genus Pestalotiopsis; addition of P. steyaertii and P. magna sp. **nov.Mycological Progress**, v. 13, n. 3, p. 617-624, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N; HYDE K.D. ; GROENEWALD J.Z. ; XU J. ; CROUS P.W. . Pestalotiopsis revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 121–186, 2014.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S., GUO, L. D., CHUKEATIROTE, E., BAHKALI, A. H., & HYDE, K. D. Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 167, 2011.

MARQUES, 2018 <http://revistapesquisa.fapesp.br/2018/06/18/obstaculos-nocaminho/> acesso em dezembro 2018.

MARTINEZ, A. T., RUIZ-DUEÑAS, F. J., CAMARERO, S., SERRANO, A., LINDE, D., LUND, H., ... & LIERS, C. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 6, p. 815-831, 2017.

MARTÍNEZ, Á. T., SPERANZA, M., RUIZ-DUEÑAS, F. J., FERREIRA, P., CAMARERO, S., GUILLÉN, F., ... & RÍO ANDRADE, J. C. D. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. 2005.

MATE, D. M., & ALCALDE, M. Laccase: a multi purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1457-1467, 2017.

MAY, S. W. Applications of oxidoreductases. **Current opinion in biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 370-375, 1999.

MISHRA, V., JANA, A. K., JANA, M. M., & GUPTA, A. Fungal pretreatment of sweet sorghum bagasse with supplements: improvement in lignin degradation, selectivity and enzymatic saccharification. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 110, 2017.

NAG RAG, T. R. Coelomycetes Anamorphs with Appendage-Bearlng Conidia. **Mycologue Publications**, 1993.

NAGHDI, M., TAHERAN, M., BRAR, S. K., KERMANSHAHI-POUR, A., VERMA, M., & SURAMPALLI, R. Y. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. **Environmental pollution**, v. *234*, p. 190-213, 2018.

NAKATANI Y.; LAMONT I. L.; CUTFIELD J. F. Discovery and Characterization of a Distinctive Exo-1,3/1,4-beta-glucanase from the Marine Bacterium Pseudoalteromonas sp. Strain BB1. **Enzymology and Protein Engineering**, v. 76, p. 6760-6768, 2010.

NI, J.; TOKUDA, G. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 6, p. 838-850, 2013.

NUNES, C. S., & KUNAMNENI, A. (2018). **Laccases—properties and applications. In Enzymes in human and animal nutrition** (pp. 133-161). Academic Press.

NYANHONGO, G. S., GOMES, J., GÜBITZ, G. M., ZVAUYA, R., READ, J., & STEINER, W. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of Trametes modesta. **Water Research**, v. 36, n. 6, p. 1449-1456, 2002.

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

OLIVEIRA, C. M. de. Energia renovável. Curitiba: ABIB, 2011. Disponível em: http://pt.calameo.com/read/00020096870b93510ec6c. Acesso em: fevereiro 2020

PATEL, H., CHAPLA, D., & SHAH, A. Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. *109*, p. 323-331, 2017.

PATEL, I; KRACHER, D.; MA, S.; GARAJOVA, S.; HAON, M.; FAULDS, C. B.; RECORD, E. Salt-responsive lytic polysaccharide monooxygenases from the mangrove fungus Pestalotiopsis sp. NCi6. **Biotechnology of Biofuels**, 9:108, 2016.

PATRICK, F., MTUI, G., MSHANDETE, A. M., & KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of Pleurotus sajorcaju. **African journal of biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10166-10177, 2011.

POLIZELI, M. L. T. M., RIZZATTI, A. C. S., MONTI, R., TERENZI, H. F., JORGE, J. A., & AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POLLEGIONI, L., TONIN, F., & ROSINI, E. Lignin degrading enzymes. **The FEBS journal**, v. 282, n. 7, p. 1190-1213, 2015.

PRAJAPATI, B. P., JANA, U. K., SURYAWANSHI, R. K., & KANGO, N. Sugarcane bagasse saccharification using Aspergillus tubingensis enzymatic cocktail for 2G bioethanol production. **Renewable Energy**, v. *152*, p. 653-663, 2020.

PROSKURINA, S., JUNGINGER, M., HEINIMÖ, J., TEKINEL, B., & VAKKILAINEN, E. Global biomass trade for energy—Part 2: Production and trade streams of wood pellets, liquid biofuels, charcoal, industrial roundwood and emerging energy biomass. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 2, p. 371-387, 2019.

RAKOTOARIVONINA, H., REVOL, P. V., AUBRY, N., & RÉMOND, C. The use of thermostable bacterial hemicellulases improves the conversion of lignocellulosic biomass to valuable molecules**. Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7577-7590, 2016.

RAMOS, J. A. T., BARENDS, S., VERHAERT, R. M., & DE GRAAFF, L. H. The Aspergillus niger multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccaselike encoding genes. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 1, p. 78, 2011.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., & EICHHORN, S. E. (2001). **Biologia vegetal**. 6ª edição. Guanabara Koogan SA.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, n. 2, p. 265-270, 1950.

RIVA S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends Biotechnol**, v. 25, n. 5, p. 219-26, 2006.

RIVERA-HOYOS, C. M., MORALES-ÁLVAREZ, E. D., POUTOU-PIÑALES, R. A., PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M., RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R., & DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3-4, p. 67-82, 2013.

ROCHA-MARTÍN, J., MARTINEZ-BERNAL, C., PÉREZ-COBAS, Y., REYES-SOSA, F. M., & GARCÍA, B. D. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. *244*, p. 48-56, 2017.

ROGALSKI, J., DAWIDOWICZ, A. L., & LEONOWICZ, A. Purification and immobilization of the inducible form of extracellular laccase of the fungus Trametes versicolor. **Acta biotechnologica**, v. 10, n. 3, p. 261-269, 1990.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F.. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades.** 2009.

ROSCONI, F., FRAGUAS, L. F., MARTÍNEZ-DRETS, G., & CASTRO-SOWINSKI, S. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by Sinorhizobium meliloti. **Enzyme and microbial technology**, v. 36, n. 5-6, p. 800-807, 2005.

RUDAKIYA, D. M., PATEL, D. H., & GUPTE, A. Exploiting the potential of metal and solvent tolerant laccase from Tricholoma giganteum AGDR1 for the removal of pesticides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 586-595, 2020.

RÜHL, M. (2010). **Laccases and other ligninolytic enzymes of the basidiomycetes Coprinopsis cinerea and Pleurotus ostreatus**. Cuvillier Verlag.

RUSSELL J. R.; CULLEN, D.; KURTZMAN, C. P.; KHACHATOURIANS, G. G.;HEGEDUS, D. D. Molecular Methods for Discriminating Taxa, Monitoring Species, and Assessing. **Fungal Diversity**, cap. 6, p. 77-102, 2004

RÜTTIMANN-JOHNSON, C., SALAS, L., VICUÑA, R., & KIRK, T. K. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by Ceriporiopsis subvermispora. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 6, p. 1792-1797, 1993.

RYAN, S., SCHNITZHOFER, W., TZANOV, T., CAVACO-PAULO, A., & GÜBITZ, G. M. An acid-stable laccase from Sclerotium rolfsii with potential for wool dye decolourization. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 6, p. 766-774, 2003.

SACCO L. P. **ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENZIMAS DE INTERESSE EM PROCESSOS BIOTECVOLÓGICOS**. 2013. 60. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista – Unesp, Jaboticabal, SP.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SÁNCHEZ, Ó. J., & CARDONA, C. A. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. **Interciencia**, v. *30*, n. 11, p. 671-678, 2005.

SANDGREN, M., STÅHLBERG, J., & MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SANTOS, Y. Q. **PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CELULASE TERMOSTÁVEL E HALOTOLERANTE DE UMA LINHAGEM MARINHA DE Bacillus sp.** 2016. 75 f. dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal-RN.

SAPARRAT, M. C., GUILLÉN, F., ARAMBARRI, A. M., MARTÍNEZ, A. T., & MARTÍNEZ, M. J. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete Coriolopsis rigida. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 68, n. 4, p. 1534-1540, 2002.

SARITHA, M., & ARORA, A. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 2, p. 122-130, 2012.

SAXENA, A., TRIPATHI, B. P., KUMAR, M., & SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. **Advances in colloid and interface science**, v. 145, n. 1-2, p. 1-22, 2009.

SCHMIDT, J., GRUBER, K., KLINGLER, M., KLÖCKL, C., CAMARGO, L. R., REGNER, P,... & WETTERLUND, E. A new perspective on global renewable energy systems: why trade in energy carriers matters. **Energy & Environmental Science**, v. 12, n. 7, p. 2022-2029, 2019.

SCHNEIDER, P., CASPERSEN, M. B., MONDORF, K., HALKIER, T., SKOV, L. K., ØSTERGAARD, P. R., ... & XU, F. Characterization of a Coprinus cinereus laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 6, p. 502-508, 1999.

SETHI, A., & SCHARF, M. E. Biofuels: fungal, bacterial and insect degraders of lignocellulose. **e LS**. 2001.

SETHI, A., SLACK, J. M., KOVALEVA, E. S., BUCHMAN, G. W., & SCHARF, M. E. Lignin-associated metagene expression in a lignocellulose-digesting termite. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 1, p. 91-101, 2013.

SHARMA, D., PRAMANIK, A., & AGRAWAL, P. K. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus Pestalotiopsis neglecta BAB-5510 isolated from leaves of Cupressus torulosa D. Don. **3 Biotech**, v. *6*, n. 2, p. 210, 2016.

SHARMA, D., PRAMANIK, A., & AGRAWAL, P. K. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus Pestalotiopsis neglecta BAB-5510 isolated from leaves of Cupressus torulosa D. Don. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 210, 2016.

SILVA, E. A. **ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE E CRESCIMENTO MICELIAL DE TRÊS FUNGOS AMAZÔNICOS DEGRADADORES DE MADEIRA**. 2006. Dissertação. Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

SINGHANIA, R. R., SUKUMARAN, R. K., & PANDEY, A. Improved cellulase production by Trichoderma reesei RUT C30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 1, p. 60-70, 2007.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 433-443, 2008.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E. J.; SIDHU, R. S.; SUMMERCELL, B. Pestalotiopsis guepinii, a taxol producing endophyte of the Wollemi Pine, Wollemianobilis. **Australian Journal Botanic**, v. 45, p. 1073-1082, 1997

SUBRAMANIAN, J., RAMESH, T., & KALAISELVAM, M. Fungal laccases-properties and applications: a review. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive**, v. 5, n. 2, p. 8-16, 2014.

SUN, Y., & CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUTTON, B.C.The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervular and Stromata. **Common wealth Mycological Institute**, p. 696, 1980.

SUTTON, B.C.The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervular and Stromata. **Common wealth Mycological Institute**, p. 696, 1980.

SUWANNARACH, N.; SUJARIT, K.; KUMLA, J.; BUSSABAN, B.; LUMYONG, S. First report of leaf spot disease on oil palm caused by Pestalotiopsis theae in Thailand. **Journal of general plant pathology**, v. 79, n. 4, p. 277-279, 2013.

SZCZERBOWSKI, D., PITARELO, A. P., ZANDONÁ FILHO, A., & RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014.

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

UNICA. União da indústria de cana-de-açúcar. Disponivel em: <http://www.novacana.com/n/cana/safra/unica-atualizacao-quinzenal-safra-2018-192-quinzena-novembro-111218> acesso em janeiro 2019.

VALENCIA E. Y.; CHAMBERGO F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics Biology**, v. 91, p. 9-18, 2011.

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

VANTAMURI, A. B., & KALIWAL, B. B. Purification and characterization of laccase from Marasmius species BBKAV79 and effective decolorization of selected textile dyes. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 189, 2016.

VAZ A. B. M., **DIVERSIDADE E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À ESPÉCIES DA SUB-FAMÍLIA MIRTOIDEAE (MYRTACEAE) PRESENTES EM ECOSSISTEMAS DO BRASIL, ARGENTINA E ESPANHA.** 2012. 115. Tese (Pós-doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

VISWANATH, B., RAJESH, B., JANARDHAN, A., KUMAR, A. P., & NARASIMHA, G. Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme research**, 2014.

WAN, C., & LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1447-1457, 2012.

WANG, H., HUANG, L., LI, Y., MA, J., WANG, S., ZHANG, Y., ... & LIU, Y. Characterization and application of a novel laccase derived from Bacillus amyloliquefaciens. **International journal of biological macromolecules**, 2019.

WANG, H., HUANG, L., LI, Y., MA, J., WANG, S., ZHANG, Y., ... & LIU, Y. Characterization and application of a novel laccase derived from Bacillus amyloliquefaciens. **International journal of biological macromolecules**. 2019.

WANG, J., CHIO, C., CHEN, X., SU, E., CAO, F., JIN, Y., & QIN, W. Efficient saccharification of agave biomass using Aspergillus niger produced low-cost enzyme cocktail with hyperactive pectinase activity. **Bioresource technology**, v. 272, p. 2633, 2019.

WANG, L., YAN, W., CHEN, J., HUANG, F., & GAO, P. Function of the iron-binding chelator produced by Coriolus versicolor in lignin biodegradation. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 51, n. 3, p. 214, 2008.

WANG, X.: ZHANG, X.; LIU, L.; XUANG, M.; WANG, W.; SUN, X.; CHE, Y.; GUO, L.; LIU, G.; GUO, L.; WANG, C.; YIN, W. Genomic and transcriptomic analysis of the endophytic fungus Pestalotiopsis reveals its lifestyle and high potential for synthesis of natural products. **BMC Genomics**. 2015.

WANG, Y., BARTH, D., TAMMINEN, A., & WIEBE, M. G. Growth of marine fungi on polymeric substrates. **BMC biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 3, 2016.

WIKEE, S., HATTON, J., TURBÉ-DOAN, A., MATHIEU, Y., DAOU, M., LOMASCOLO, A., ... & RECORD, E. Characterization and Dye Decolorization Potential of Two Laccases from the Marine-Derived Fungus Pestalotiopsis sp. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 1864, 2019.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. p.315-322. 1990.

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

XU, J. ; YANG, X.; & LIN, Q. Chemistry and Biology of Pestalotopsis – derived natural products. **Fungal Diversity**, v. 66, p. 37-68, 2014.

YADAV, M., BISTA, G., MAHARJAN, R., POUDYAL, P., MAINALI, M., SREERAMA, L., & JOSHI, J. Secretory laccase from Pestalotiopsis Species CDBT-F-G1 fungal strain isolated from high altitude: Optimization of its production and characterization. **Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 340, 2019.

YANG, X. L., ZHANG, J. Z., & LUO, D. Q. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal Pestalotiopsis genus. **Natural product reports**, v. 29, n. 6, p. 622-641, 2012.

YANTO, D. H. Y., & TACHIBANA, S. Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn2+ and H2O2 by Pestalotiopsis sp. in liquid medium and soil. **Chemosphere**, v. 103, p.105-113, 2014.

YANTO, D. H. Y., & TACHIBANA, S. Potential of fungal co-culturing for accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. **Journal of hazardous materials**, v. 278, p. 454-463, 2014.

YOON, J., & SOLOMON, E. I. Electronic structure of the peroxy intermediate and its correlation to the native intermediate in the multicopper oxidases: insights into the reductive cleavage of the O− O bond. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 43, p. 13127-13136, 2007.

YOSHIDA, H. LXIII.—chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 43, p. 472-486, 1883.

YUAN, J.; JIAN-NAN, B. I.; BING, Y. A. N.; XU-DONG, Z. Taxol-prducing Fungi: A New Approach to Industrial Production of Taxol. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, p .1-6, 2006.

ZHANG, Q., AKHBERDI, O., WEI, D., CHEN, L., LIU, H., WANG, D., ... & ZHU, X. A MYST histone acetyltransferase modulates conidia development and secondary metabolism in Pestalotiopsis microspora, a taxol producer. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

ZHANG, S., WANG, X. N., ZHANG, X. L., LIU, X. Z., & ZHANG, Y. J. Complete mitochondrial genome of the endophytic fungus Pestalotiopsis fici: features and evolution. **Applied microbiology and biotechnology**, v. *101*, n. 4, p. 1593-1604, 2017.

ZHANG, Y. J.; ZHANG, S.; LIU, X. Z.; WEN, H. A.; WANG, M. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 1, p. 114-118, 2010.

ZVIELY, M. (2013). **Converting lignocellulosic biomass to low-cost fermentable sugars. In Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries** (p. 133-150). Springer, Berlin, Heidelberg.

Anexos

Anexo I - Trabalhos apresentados em congressos e reuniões científicas:

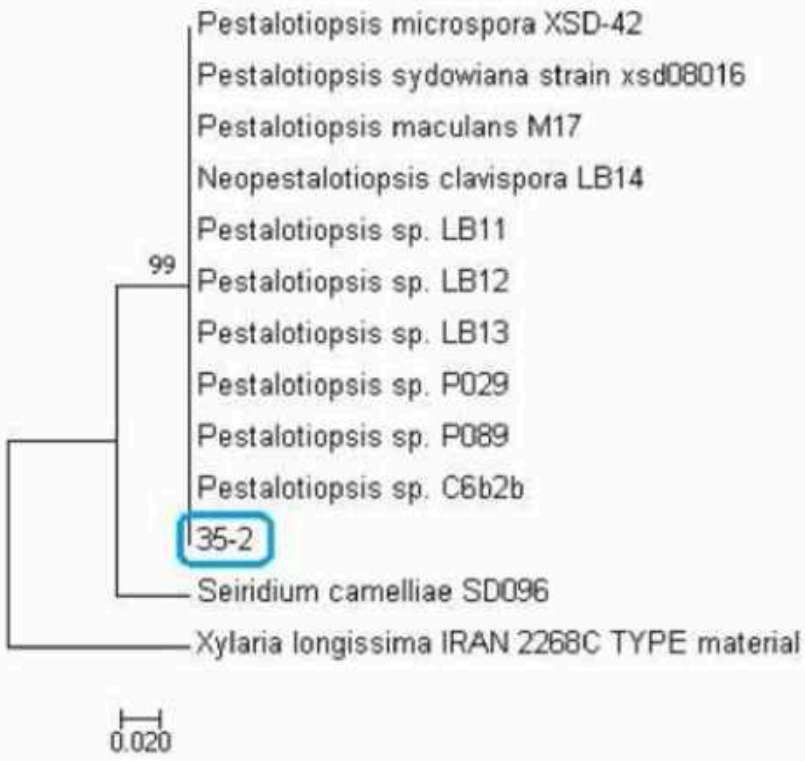
PEDROSO, D. L.; Garcia, F. S; CHAMBERGO, F. S. Oxidorreductase enzymes from *Pestalotiopsis* sp. XLVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Joinville, Santa Catarina, Brasil, 27/05/2018.

PEDROSO, D. L.; GARCIA, F. S; CHAMBERGO, F. S. Enzymes from *Pestalotiopsis* sp. for sugarcane bagasse degradation. VII Congresso Brasileiro de Biotecnologia e II Congresso Ibero-Americano de Biotecnologia. Brasília, DF, Brasil, 20/11/2018.

PEDROSO, D. L.; CHAMBERGO, F. S. Enzymes cocktail for biomass degradation. XLVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Águas de Lindoia, São Paulo, Brasil, 15/05/2018.

Anexo II – Filogenia do BBF-245

Figura II1: Árvore de distância filogenética do BBF-245 (35-2 destacado em azul) com base no 18S rRNA. Construída com auxílio do programa MEGA 7 (com parâmetro Jukes-Cantor e Bootstrap de 1000 réplicas) pela Fundação André Tosello (FAT).



Anexo III – Valores dos ensaios de caracterização da PspLac1

Tabela III1: Valores (U/L) das triplicatas da PspLac1 para determinação do pH ótimo.

pH	mmol/L.min			média	desvio padrão
3	41,18	41,18	43,61	41,99	1,40
4	34,24	34,24	37,71	35,40	2,00
5	23,26	23,26	27,78	24,77	2,61
6	16,60	16,53	16,53	16,55	0,04
7	11,32	4,03	4,03	6,46	4,21
8	9,24	8,89	8,89	9,01	0,20
9	2,92	2,78	2,78	2,83	0,08
10	1,04	1,04	1,04	1,04	0,00
11	1,25	1,25	1,32	1,27	0,04
12	0,35	0,35	0,35	0,35	0,00

Tabela III2: Valores das duplicatas em percentual de atividade remanescente do ensaio para de estabilidade térmica da PspLac1.

Tempo (min)	80°C		60°C		40°C		20°C	
0	100	100	100	100	100	100	100	100
30	0	0	89	81	100	100	100	100
60	0	0	70	78	100	90	100	100
90	0	0	48	68	86	97	100	100
120	0	0	41	61	89	100	100	100

Tabela III3: Valores (U/L) das sextuplicatas da cinética enzimática da PspLac1.

mM	mmol/L.min						média	desvio padrão
0,50	2,01	2,01	2,08	1,81	1,81	2,01	1,96	0,12
1,00	4,44	4,51	4,51	4,44	4,51	4,44	4,48	0,04
2,00	10,63	9,93	10,07	9,79	9,79	10,07	10,05	0,31
5,00	15,97	14,65	14,65	15,21	15,35	15,28	15,19	0,50
10,00	30,42	32,01	31,94	30,42	30,49	31,60	31,15	0,78
20,00	42,92	47,22	45,97	47,43	48,68	42,92	45,86	2,43
30,00	51,04	52,57	54,24	55,42	51,04	53,19	52,92	1,75
40,00	60,97	58,06	57,22	61,04	57,22	58,26	58,80	1,76
50,00	55,28	55,28	57,92	58,40	57,50	53,96	56,39	1,79

Tabela III4: Valores das sextuplicatas em linearização de LineaweaverBurke da cinética enzimática da PspLac1.

1/[S]	$1/[V_0]$						média	desvio padrão
2,00	0,50	0,50	0,48	0,55	0,55	0,50	0,51	0,03
1,00	0,23	0,22	0,22	0,23	0,22	0,23	0,22	0,00
0,50	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,00
0,20	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,00
0,10	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,00
0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00

Anexo IV – Valores dos ensaios de caracterização da PspLac2

Tabela IV1: Valores (U/L) das triplicatas da PspLac2 para determinação do pH ótimo.

pH	mmol/L.min			média	desvio padrão
3	13,13	12,71	10,76	12,20	1,26
4	18,75	15,49	16,60	16,94	1,66
5	15,83	15,63	15,76	15,74	0,11
6	8,75	7,08	9,51	8,45	1,24
7	4,03	4,44	4,17	4,21	0,21
8	2,15	2,43	2,36	2,31	0,14
9	0,83	0,83	0,90	0,86	0,04
10	1,04	1,04	1,04	1,04	0,00
11	1,25	1,25	1,25	1,25	0,00
12	0,28	0,28	0,28	0,28	0,00

Tabela IV2: Valores das duplicatas em percentual de atividade remanescente do ensaio para de estabilidade térmica da PspLac2.

Tempo (min)	80°C		60°C		40°C		20°C	
0	100	100	100	100	100	100	100	100
30	0	0	74	60	97	93	100	100
60	0	0	63	60	75	78	100	100
90	0	0	65	50	91	86	100	100
120	0	0	62	53	99	91	100	100

Tabela IV3: Valores (U/L) das sextuplicatas da cinética enzimática da PspLac2.

mM	mmol/L.min						média	desvio padrão
0,50	0,76	0,69	0,63	0,69	0,63	0,63	0,67	0,05
1,00	1,94	1,67	1,88	1,94	1,88	1,67	1,83	0,13
2,00	4,86	5,14	4,86	5,14	4,86	5,00	4,98	0,14
5,00	8,75	8,61	8,47	8,75	8,61	8,47	8,61	0,13
10,00	18,68	17,64	17,57	17,99	17,57	17,71	17,86	0,43
20,00	18,54	22,08	22,08	18,75	18,54	20,49	20,08	1,71
30,00	19,10	19,17	18,68	18,33	18,33	19,51	18,85	0,48
40,00	19,79	20,21	21,04	21,18	19,72	19,72	20,28	0,67
50,00	19,38	20,21	19,38	20,00	20,76	19,58	19,89	0,55

Tabela IV4: Valores das sextuplicatas em linearização de LineaweaverBurke da cinética enzimática da PspLac2.

1/[S]	1/[V0]						média	desvio padrão
2,00	1,32	1,45	1,59	1,45	1,59	1,59	1,50	0,11
1,00	0,52	0,60	0,53	0,52	0,53	0,60	0,55	0,04
0,50	0,21	0,19	0,21	0,19	0,21	0,20	0,20	0,01
0,20	0,11	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,12	0,00
0,10	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00
0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00
0,03	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00
0,03	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00
0,02	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00

Anexo V– Valores da atividade de oxidorredutases produzidas por *Pestalotiopsis* sp. (BBF-245) em MBC 1% de bagaço da cana-de-açúcar

Tabela V1: Valores (U/mg) da atividade de oxidorredutases dosadas no cultivo do *Pestalotiopsis* sp. em MBC com 1% de bagaço da cana-de-açúcar.

Psp Lac							
dias	4	5	6	7	8	9	10
	2.012,16	775,88	1.148,92	940,52	755,15	613,04	478,40
	1.992,81	808,64	1.130,70	910,74	753,31	615,88	512,04
	2.015,14	797,02	1.201,67	979,91	768,95	613,99	514,84
média	2.006,70	793,85	1.160,43	943,72	759,14	614,30	501,76
desvio padrão	12,12	16,61	36,86	34,70	8,55	1,45	20,28

Psp LiP							
dias	4	5	6	7	8	9	10
	6,58	25,72	29,70	140,25	18,31	37,78	107,48
	6,58	32,73	31,82	72,25	22,38	65,07	97,14
média	6,58	29,23	30,76	106,25	20,35	51,43	102,31
desvio padrão	0,00	4,96	1,50	48,08	2,88	19,30	7,31

Psp MnP							
dias	4	5	6	7	8	9	10
	1,39	9,88	6,28	7,19	3,44	15,08	0,87
	1,39	7,91	2,69	17,97	4,30	17,75	1,75
média	1,39	8,90	4,49	12,58	3,87	16,42	1,31
desvio padrão	0,00	1,39	2,54	7,62	0,61	1,89	0,62

Lac – lacases

LiP – lignina peroxidases

MnP – manganês peroxidases

Anexo VI – Dados de estratégias de concentração do sobrenadante de *Pestalotiopsis* sp. (BBF-245) em MBC 1% de bagaço da cana-de-açúcar

Tabela VI1: Atividade de lacases (U/mg) por comparativo de estratégias de concentração do sobrenadante do fungo BBF-245 (Solvente orgânico e *salt-in*)

	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
Álcool etílico (U/mg)			3,32	12,62	1,18	6,69	1,16	6,54
Sulfato de Amônio (U/mg)	19,44	22,22	14,81	16,67	26,85	75,00	295,37	39,81

Tabela VI2: Atividade de lacases (U/L) por comparativo de estratégias de concentração do sobrenadante do fungo BBF-245 (Liofilização e concentração por centrifugação (speed))

Lacase			ΔA 420nm	
Frações	**Coeficiente de extinção (ABTS)**	**ΔReação de inclinação**	**Ativ mMol min**	**mMol/ L min**
Liofilização	36000	0,058	1,61	40,28
Speed	36000	0,0624	1,73	43,33

Anexo VII – Dados de atividade de lacases dos picos coletados da cromatografia de troca iônica

Tabela VII1: Atividade de lacases (U/L) dos picos coletados na cromatografia da amostra de *Pestalotiopsis* sp.

Lacase				ΔA 420nm		
Frações	**Picos**	**Coeficiente de extincao ABTS**	**ΔReação inclinação**	**Amostra**	**Ativ mmol min**	**mmol/ L min**
Injeção	3	36000	0,0000	0,04	-0,00	-0,00
25%	7	36000	0,0072	0,04	0,20	5,00
	8	36000	0,1049	0,04	2,91	72,85
	9	36000	0,1049	0,04	2,91	72,85
50%	12	36000	0,0562	0,04	1,56	39,03
	13	36000	0,4231	0,04	11,75	293,82
	14	36000	0,0035	0,04	0,10	2,43
75%	18	36000	0,0026	0,04	0,07	1,81
100%	23	36000	0,0008	0,04	0,02	0,56