



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO**  
**PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E**  
**IMUNOLOGIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**ALEX GRAÇA CONTATO**

**ESTUDOS MOLECULARES E FUNCIONAIS DE**  
**XILOGLUCANASES E LIQUENASES FÚNGICAS:**  
**APLICAÇÕES NA HIDRÓLISE DE BIOMASSA**  
**LIGNOCELULÓSICA**

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2023**

ALEX GRAÇA CONTATO

ESTUDOS MOLECULARES E FUNCIONAIS DE  
XILOGLUCANASES E LIQUENASES FÚNGICAS: APLICAÇÕES  
NA HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências  
– Área de Concentração: Bioquímica

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

***RESUMO***

CONTATO, A.G. **Estudos moleculares e funcionais de xiloglucanases e liquenases fúngicas: aplicações na hidrólise de biomassa lignocelulósica.** 2023. 259 p. Tese (Doutorado em Ciências - área de concentração Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A biomassa lignocelulósica é constituída de três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Sua degradação e conversão são atrativas em biotecnologia. O fracionamento da parede celular não é um processo simples, porém, as enzimas microbianas podem ser a solução. Nesse sentido, o primeiro passo foi prospectar enzimas fúngicas lignocelulolíticas com potencial aplicação industrial, produzidas por meio de análise temporal utilizando sementes de jatobá e tamarindo, resíduos da indústria de polpa de frutas, como fontes de carbono. As enzimas foram produzidas por oito fungos filamentosos isolados e identificados. Os melhores produtores quanto à atividade enzimática foram *Thermothelomyces thermophilus* e *Trichoderma longibrachiatum*. As condições ótimas para a produção das enzimas foram os meios suplementados com sementes de tamarindo, sob agitação, por 72 h. Em seguida, foi realizada a sacarificação de três variedades de cana-de-açúcar (bagaço de cana *in natura*, e colmos de cana SP80-3280 e de cana Energia) pré-tratadas por autohidrólise ou quimicamente, além do bagaço explodido. Conhecendo-se a produção enzimática, foi escolhido o maior produtor de xiloglucanases, já que o xiloglucano é a hemicelulose predominante da parede celular primária de plantas superiores. Desta maneira, as enzimas que clivam este polímero apresentam grande utilidade na degradação e conversão da biomassa lignocelulósica. Portanto, visou-se a otimização da produção da xiloglucanase de *T. longibrachiatum* usando um delineamento do composto central rotacional bem como a imobilização em suportes iônicos, como MANAE, DEAE, CM-celulose e PEI, visto que o processo de imobilização pode ser utilizado para solucionar problemas relacionados à estabilidade, além dos benefícios econômicos trazidos pela possibilidade de seu uso repetido e recuperação. Este estudo descreveu, pela primeira vez, a imobilização de uma xiloglucanase fúngica utilizando estes suportes. A partir destes resultados, foram realizados experimentos de biologia molecular. Portanto, uma xiloglucanase da família GH74 com peso molecular de 77 kDa foi identificada e sua sequência gênica foi otimizada para clonagem e expressão em *A. nidulans* A773. Em seguida, foi realizada a análise do secretoma dos microrganismos, sendo que *T. thermophilus* cultivado por fermentação submersa com sementes de tamarindo revelou 80 CAZymes distintas, com destaque para a família GH16, conhecida por produzir liquenases, uma enzima de interesse econômico e industrial. A produção de liquenase foi confirmada através de ensaios enzimáticos. Enquanto, a análise do secretoma de *T. longibrachiatum* cultivado por fermentação submersa com dois resíduos lignocelulósicos, bagaço de cana e sementes de tamarindo, além de uma simulação de hemicelulose, revelou 206 CAZymes distintas, sendo que em cada condição houve particularidades e diferenças, principalmente no cultivo utilizando as sementes de tamarindo que produziram maior número de hemicelulases. Por esse motivo, esse resíduo foi escolhido para realizar o cocultivo de *T. longibrachiatum* com *T. thermophilus*, que foram cultivados em biorreator e houve aumento na produção de proteínas. Esses resultados sugerem que o cocultivo entre esses microrganismos tem potencial para produzir um coquetel enzimático com alto desempenho na hidrólise de materiais na indústria sucroalcooleira.

**Palavras-chave:** bioenergia; biorrefinaria; biomassa lignocelulósica; hidrólise enzimática; pré-tratamento; xiloglucanases; liquenases; *T. longibrachiatum*; *T. thermophilus*.

***ABSTRACT***

CONTATO, A.G. **Molecular and functional studies of fungal xyloglucanases and lichenases: applications in the hydrolysis of lignocellulosic biomass.** 2023. 259 p. Thesis (Doctorate in Sciences - Biochemistry concentration area) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

The lignocellulosic biomass comprises three main components: cellulose, hemicellulose, and lignin. Its degradation and conversion are attractive in biotechnology. Fractionation of the cell wall is not a simple process; however, microbial enzymes may be the solution. The first step was to prospect lignocellulolytic fungal enzymes with potential industrial application, produced through temporal analysis using jatoba and tamarind seeds, residues from the fruit pulp industry, as carbon sources. Enzymes were produced by eight isolated and identified filamentous fungi. The best producers regarding enzymatic activity were *Thermothelomyces thermophilus* and *Trichoderma longibrachiatum*. The optimal conditions for enzyme production were media supplemented with tamarind seeds, under agitation, for 72 h. Then, the saccharification of three sugarcane varieties (sugarcane bagasse, and SP80-3280 and Energy cane culms) pre-treated by autohydrolysis or chemically, in addition to the steam explosion sugarcane bagasse, was performed. Knowing the enzymatic production, the largest producer of xyloglucanases was chosen, since xyloglucan is the predominant hemicellulose of the primary cell wall of higher plants. In this way, the enzymes that cleave this polymer are very useful in the degradation and conversion of lignocellulosic biomass. Therefore, the aim was to optimize the production of xyloglucanase from *T. longibrachiatum* using a central composite rotatable design as well as immobilization on ionic supports such as MANAE, DEAE, CM-cellulose and PEI, since the immobilization process can be used to solve problems related to stability, in addition to the economic benefits brought by the possibility of its repeated use and recovery. This study described, for the first time, the immobilization of a fungal xyloglucanase using these supports. Based on these results, molecular biology experiments were performed. Therefore, a GH74 xyloglucanase with a molecular weight of 77 kDa was identified and its gene sequence was optimized for cloning and expression in *A. nidulans* A773. Then, the analysis of the secretome of the microorganisms secretome were performed. *T. thermophilus* cultivated by submerged fermentation with tamarind seeds revealed 80 distinct CAZymes, especially the GH16 family, known for producing lichenases, an enzyme of economic and industrial interest. The production of lichenase was confirmed through enzymatic assays. Meanwhile, the analysis of the *T. longibrachiatum* secretome cultivated by submerged fermentation with two lignocellulosic residues, sugarcane bagasse and tamarind seeds, in addition to a simulation of hemicellulose, revealed 206 distinct CAZymes, and in each condition there were particularities and differences, mainly in cultivation using the tamarind seeds that produced the highest number of hemicellulases. For this reason, this residue was chosen to perform the co-culture of *T. longibrachiatum* with *T. thermophilus*, which were cultivated in a bioreactor and increased the protein production. These results suggest that the co-culture between these microorganisms has the potential to produce an enzymatic cocktail with high performance in the hydrolysis of materials in the sugar and alcohol industry.

**Keywords:** bioenergy; biorefinery; lignocellulosic biomass; enzymatic hydrolysis; pretreatment; xyloglucanases; lichenases; *T. longibrachiatum*; *T. thermophilus*.