

FÁBIO DE SOUZA GARCIA

**ENZIMAS OXIDORREDUTASES PRODUZIDAS POR
FUNGOS FILAMENTOSOS**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde.

Versão original

São Paulo
2018

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

I Introdução

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

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

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

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

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

1 Revisão de literatura

1.1 Lignocelulose

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

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

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

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

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

As enzimas fúngicas envolvidas na degradação de polissacarídeos vegetais são atribuídas à pelo menos 35 famílias de glicosídeo hidrolases (GH), três famílias de esterases de carboidratos (CE) e seis famílias de polissacarídeo-liases (PL). A degradação da celulose requer principalmente três classes de enzimas, β -1,4-endoglucanases (EGL), exoglucanases / celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases (BGL), que são divididas em oito famílias de GH. Por exemplo, *Aspergillus niger* tem cinco EGLs dentro das famílias de GH 5 e 12, quatro CBHs nas famílias 6 e 7 e 13 BGLs nas famílias 1 e 3. Em comparação, um dos fungos de degradação de celulose mais eficientes *Trichoderma reesei* tem cinco EGLs caracterizados nas famílias de GH 5, 7, 12 e 45, duas CBH altamente expressas nas famílias 6 e 7, e duas BGLs caracterizadas nas famílias 1 e 3. Embora *T.*

reesei não tenha o maior número de celulases, seu conjunto de enzimas é muito eficiente na quebra de celulose, atuando de forma sinérgica, sendo as enzimas deste microrganismo as mais utilizadas na indústria do bioetanol. (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

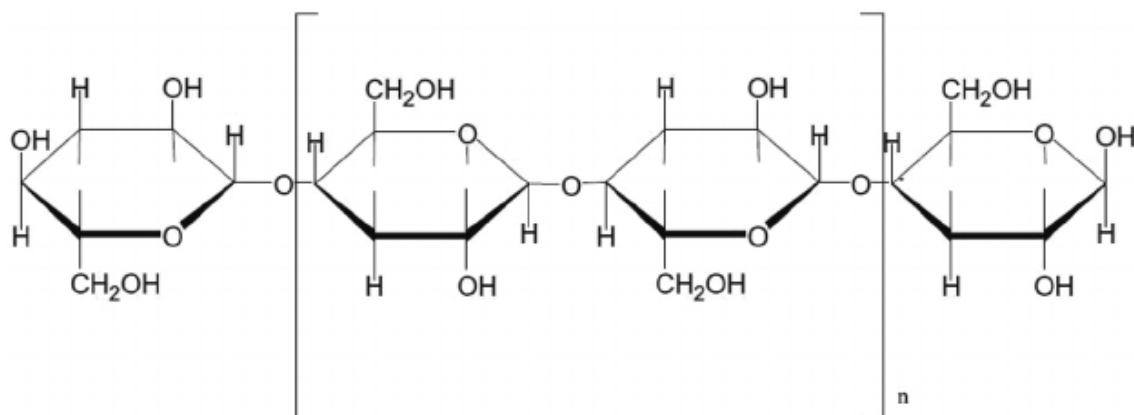


Figura 1 - Representação da estrutura química da celulose (TAKUR et al., 2014)

Em contraste com a celulose, que é um homopolímero de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas, a hemicelulose apresenta uma ampla gama de polímeros heterogêneos contendo uma espinha dorsal de xilose, arabinose, galactose ou monômeros de manose. As hemiceluloses mais comuns são os xilanos, que têm uma espinha dorsal de monômeros de xilose unidos através de ligações β (1 \rightarrow 4) e cadeias laterais de arabinose, ácido glucurônico ou seu derivado 4-O-metila e grupos laterais de acetila. A estrutura da hemicelulose, seus monômeros de espinha dorsal, seu grau de ramificação e o tipo de cadeias laterais variam amplamente entre diferentes espécies de plantas e até mesmo tecidos dentro da mesma planta. Por exemplo, os xiloglucanos dominam as paredes celulares primárias das plantas dicotiledôneas, enquanto os glucuronoarabinoxilanos são prevalentes tanto nas paredes celulares primárias como secundárias de algumas espécies de plantas monocotiledôneas (por exemplo, cana-de-açúcar e milho) (DE MAAYER et al., 2014). Tipicamente, hemiceluloses em coníferas são compostas majoritariamente de glucomananos, enquanto hemiceluloses em angiospermas são compostas principalmente de xilanos, juntamente com porcentagens variáveis de galactose, arabinose, ramnose e unidades de ácido metilglucurônico e grupos acetil (DASHTBAN et al., 2010; MARTINEZ et al., 2005).

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

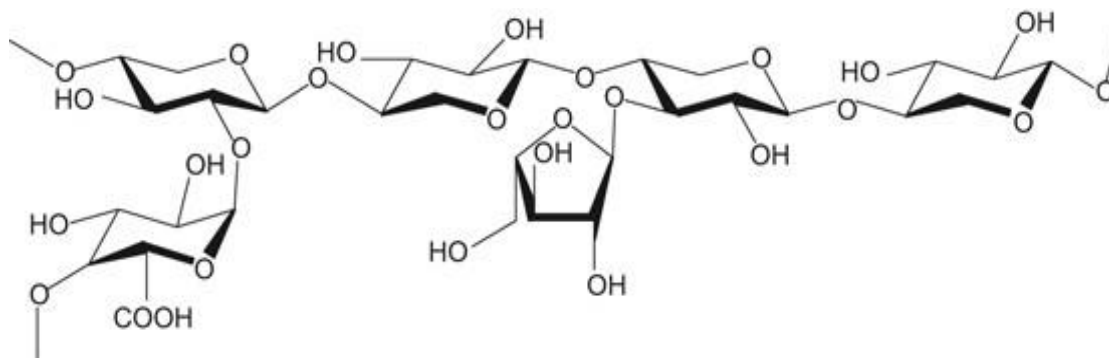


Figura 2 - Representação da estrutura química da hemicelulose (ZVIELY, 2013).

A lignina é uma macromolécula amorfa encontrada nas plantas associada a celulose na parede celular vegetal com a função de conferir rigidez e resistência a fatores mecânicos (vento, chuva) e ataques de microrganismos, aos tecidos vegetais. Uma das principais funções da lignina é apontada pela sua deposição em resposta a vários tipos de injúrias e ataques por fungos. A lignina de cicatrização protege a planta de ataques por fungos ao aumentar a resistência das paredes à penetração mecânica, protegendo-as também contra a atividade das enzimas do fungo para dentro

da planta (RAVEN et al., 2005). Em comparação com outros polímeros da parede celular, tais como pectinas e hemiceluloses, que são sintetizados no citoplasma e exportados para a parede celular, a formação do polímero de lignina ocorre diretamente na parede celular pela polimerização oxidativa de monômeros de lignina segregados (BARROS et al., 2015).

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

A conversão de lignina em diversos produtos de valor agregado desempenha um papel importante na viabilidade econômica das biorrefinarias. As metodologias de conversão de lignina podem ser divididas em três grupos: (1) hidrotermal, (2) químico e (3) enzimático. O tratamento hidrotermal foi relatado como uma excelente técnica de conversão de lignina, onde até 50% da lignina total pode ser removida da biomassa. No entanto, devido à alta temperatura e pressão, a reação de condensação entre os fragmentos de lignina altamente reativos acelera a geração de produtos tóxicos. O tratamento químico utiliza agentes específicos para cozinhar o material sob pressão, podendo ser basicamente ácidos (sulfitos) ou alcalinos (sulfato e soda). Apesar de sua eficiência tem como desvantagem a formação de resíduos altamente tóxicos, sendo responsáveis por grande parte dos resíduos gerados pelas indústrias de papel e celulose. Por outro lado, muitas aplicações utilizando microrganismos que degradam lignina e suas enzimas tem se tornado atrativas, gerando tecnologias ambientalmente favoráveis para as indústrias de papel e polpa de madeira, e para o tratamento de muitos compostos xenobióticos, corantes e resíduos industriais. O principal grupo de enzimas lignolíticas inclui lignina peroxidase, manganês peroxidase, peroxidases versáteis e lacases. Devido às estruturas específicas, diferentes enzimas lignolíticas

possuem diferentes mecanismos de degradação / oxidação de lignina e produzem diferentes compostos (HATAKKA, 2015; TANG et al., 2015).

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

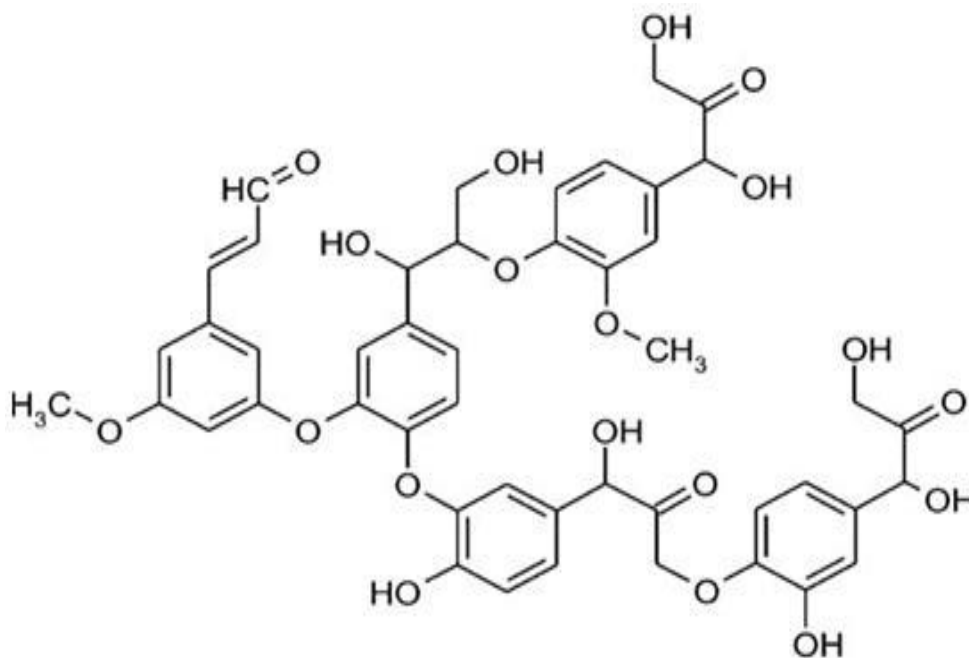


Figura 3 - Representação da estrutura química da lignina (SOYGUN et al., 2013).

1.2 Degradação da lignocelulose e processos biotecnológicos

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

perspectiva de valorização dos resíduos lignocelulósicos para obtenção de produtos de maior valor agregado deve ser uma estratégia efetiva de gerenciamento destes resíduos (FALADE et al., 2016).

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

Em geral a produção de bioetanol de segunda geração através do material de lignocelulose inclui três etapas: Pré-tratamento, sacarificação e fermentação. O processo de pré-tratamento modifica a estrutura da lignocelulose removendo a lignina e alterando a estrutura da celulose e da hemicelulose. A sacarificação é a transformação enzimática de celulose e hemicelulose em monossacarídeos como glicose e xilose, enquanto que a fermentação é a transformação desses monossacarídeos em etanol. As metodologias de pré-tratamento atuais utilizam processos intensivos em energia (altas pressões e temperaturas) e compostos químicos agressivos (PLACIDO; CAPAREDA, 2015). Por exemplo, o pré-tratamento químico da biomassa, com ácidos ou solventes orgânicos, antes da digestão enzimática, pode gerar subprodutos derivados da lignocelulose, como compostos fenólicos que inibem os biocatalisadores enzimáticos (DAVIDI et al., 2016). Assim a combinação gera compostos indesejáveis e ineficiências no processo. Para superar essas limitações, devem ser exploradas tecnologias sustentáveis. Diversos processos que combinam ou não essas etapas tem sido desenvolvidos para obtenção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, entre eles: co-fermentação (CF), sacarificação simultânea e fermentação (SSF), sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF) e bioprocessos consolidados (CBP) (CARDONA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2005; WYMAN, 2007).

O maior desafio para a conversão biológica da biomassa vegetal está na recalcitrância da lignocelulose. As porções celulósica e hemicelulósica da biomassa podem ser separadas da lignina e despolimerizadas para obter açúcares fermentáveis, como glicose, xilose e arabinose (LOPES,

2015). Estudos para determinar a degradação e modificação do polímero de lignina têm identificado a participação de enzimas oxidoreduzases como: lacases, peroxidases (lignina peroxidase, manganês peroxidase e versátil peroxidase) (LEE, 1997; MARTÍNEZ et al., 2005; SÁNCHEZ, 2009; SARITHA et al., 2012), e na degradação da celulose participam principalmente as enzimas: exoglucanases (EC 3.2.1.74), endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), além de enzimas que degradam hemicelulose como β -1,4-endoxilânase (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -glucuronidases (EC 3.2. 1.139), acetil-xilano esterases (EC 3.1.1.72) e esterases de ácido ferúlico / cumárico (EC 3.1.1.73) (GOMEZ DEL PUGAR; SAADEDIN, 2014; RIZK et al., 2012).

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

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

1.3 *Enzimas oxidorredutases*

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

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

Lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase são assumidas como sendo a primeira linha de proteínas expressas em fungos durante a degradação da lignina (JANUSZ et al., 2012). Devido à estrutura complexa da lignina e suas subunidades fenólicas, enzimas envolvidas em sua degradação exibem ampla especificidade pelo substrato. Além disso, para uma eficiente degradação, oxidases e peroxidases são preferidas a hidrolases devido à alta ocorrência de pontes carbono-carbono. (LEE, 1997; MARTÍNEZ et al., 2005; POLLEGIONI et al., 2015; SÁNCHEZ, 2009; SARITHA et al., 2012).

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

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

1.3.1 *Lacase (EC: 1.10.3.2)*

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

As lacases possuem papel vital no ciclo de vida dos fungos, estando envolvidas na síntese de melanina e outros pigmentos, formação de corpos de frutificação, formação de conídios, esporulação e patogênese em plantas. Estudos recentes mostram que a lacase e os genes que codificam MCOs são bastante numerosos em basidiomicetos, bem como em ascomicetos tais como *Aspergillus niger* (RAMOS et al., 2011), *Trichoderma* spp (CÁZARES-GARCÍA et al., 2013) e *Fusarium oxysporum* (KWIATOS et al., 2015), que são capazes de decompor e converter a lignocelulose vegetal. Ao contrário, reconhecem-se vários genes de lacase nos basidiomicetos não degradantes de lignina *Coprinopsis cinerea* e *Laccaria bicolor*, com funções e perfis de expressão desconhecidos (LUNDELL et al., 2010).

Para produtos industriais e biotecnológicos, as lacases foram as primeiras oxidoreduases fúngicas estudadas, fornecendo aplicativos de maior escala, como remoção de polifenóis em vinho e bebidas, conversão de compostos tóxicos e corantes têxteis em águas residuais, e no branqueamento e remoção de lignina da madeira. Além de fungos, tipos similares de MCOs

existem em plantas, insetos e bactérias mostrando a ampla distribuição dos representantes das enzimas MCO na natureza (SAKURAI; TAKAOKA, 2007).

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

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

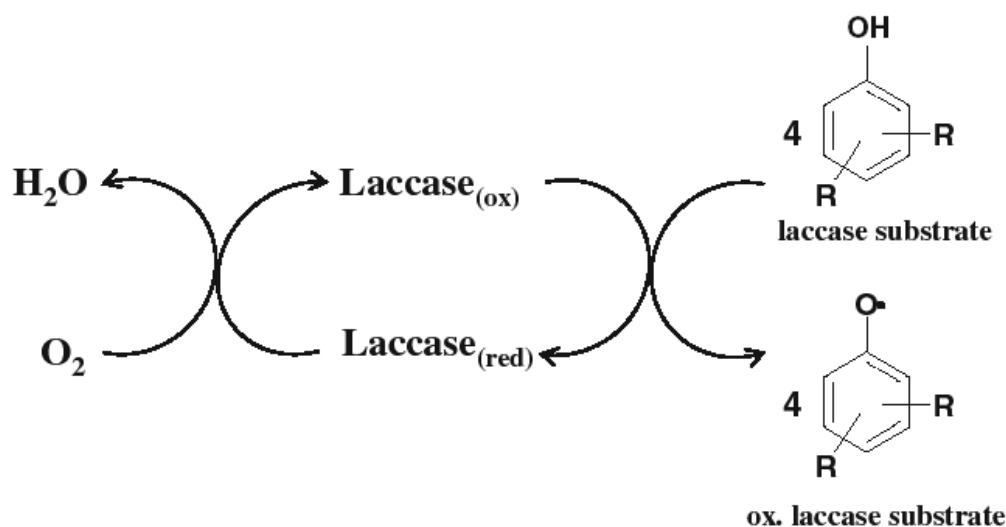


Figura 4 - Ciclo catalítico de reação mediada pela enzima lacase (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

1.3.2 Manganês peroxidase (EC: 1.11.1.13)

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

A MnP foi descoberta por Kuwahara et al., (1984) e foi descrito como a peroxidase modificadora de lignina mais comum secretada pela maioria fungos de podridão branca e decompositores de lixo. Seu envolvimento na degradação de lignina tem sido relatado e bem estudado em fungos (HOFRICHTER, 2002). O mecanismo de ação do MnP inclui a oxidação de Mn²⁺ para Mn³⁺, que é altamente reativo e, por sua vez, oxida uma ampla gama de substratos fenólicos incluindo fragmentos fenólicos da lignina. Não obstante, MnP também possui a capacidade de oxidar estruturas não fenólicas com a aplicação de mediadores, incluindo radicais lipídicos. Além disso, a capacidade de MnP de oxidar e despolimerizar lignina natural e sintética e compostos recalcitrantes também foi relatada. (FALADE et al., 2016)

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

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

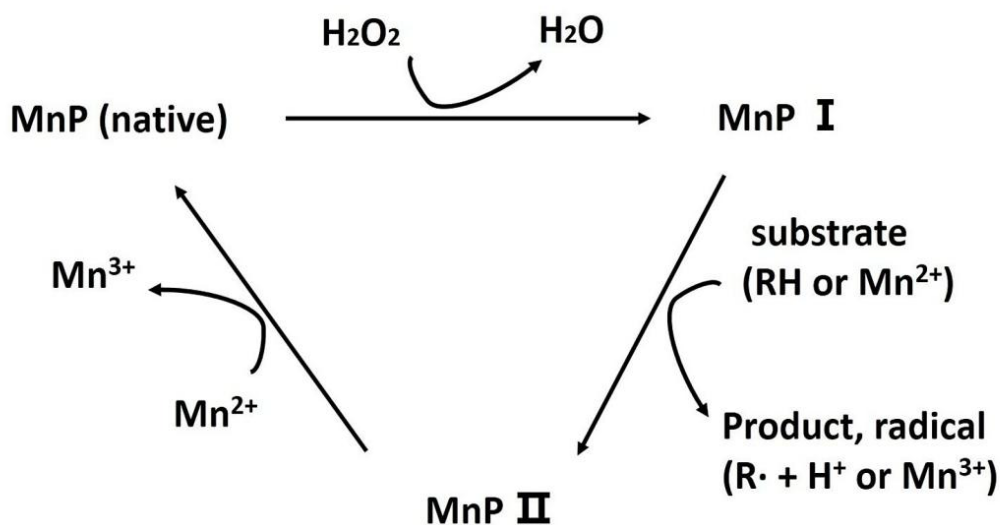


Figura 5 - Representação do ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase (QIN et al., 2014).

1.3.3 Lignina peroxidase (EC: 1.11.1.14)

Lignina peroxidase é uma heme-glicoproteína e possui um papel central na biodegradação da parede celular da lignina. LiP catalisa a oxidação de estruturas fenólicas e não fenólicas, além de uma vasta gama de compostos modelo (por exemplo, guaiacol, álcool vanilílico, catecol, ácido siérico e actosiringona). (DASHTBAN, 2010). A sua presença foi descrita pela primeira vez no basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* e tem sido a peroxidase mais estudada desde então. Sua atividade é geralmente dependente de H₂O₂ e têm potencial redox muito alto e pH ótimo baixo. Ambas estas características são importantes para a sua capacidade de oxidar uma variedade de substratos, incluindo substratos poliméricos tais como compostos corantes complexos. LiPs têm um ciclo enzimático típico, característico de outras peroxidases. LiP, MnP e versátil peroxidase compartilham características semelhantes, o que é responsável, entre outros fatores pelo seu alto potencial redox. No entanto, eles diferem nos substratos que eles podem oxidar devido à presença de diferentes sítios catalíticos em suas estruturas moleculares (OGOLA et al., 2015).

LiP oxida diferentes compostos modelo de lignina não fenólica, incluindo Ácidos de arilglicerol-arilo de tipo β-O-4. As propriedades oxidativas de LiP envolvem a formação de radicais catiônicos através da oxidação de 1 elétron, levando a clivagem de cadeia lateral, desmetilação, adição intramolecular e rearranjos. Hidroxilação de grupos metileno benzílico, oxidação de álcoois benzílicos aldeídos ou cetonas correspondentes e oxidação de fenol são outros processos oxidativos associados a LiP. Além da oxidação de substratos não fenólicos, possui a capacidade adicional de oxidar uma variedade de compostos fenólicos como como anilinas, guaiacol, A-acetossiringona, catecol, álcool vanílico e ácido siringídico. Nesta conjuntura, o álcool veratílico, um metabolito não fenólico de alto potencial redox foi sugerido como um mediador redox, sendo relatado para melhorar a atividade de lignina peroxidase na degradação de lignina. O ciclo catalítico da lignina peroxidase envolve três etapas: O primeiro passo de reação é a oxidação da enzima férrica em repouso [Fe (III)] por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como um aceitador de elétrons resultante na formação do intermediário oxo-ferril composto I. No segundo passo, o intermediário oxo-ferryl (deficiente em 2^e) é reduzido por uma molécula de substrato, tal como substrato aromático não fenólico (S) que doa um elétron (1^e) para formar o segundo intermediário, denominado composto II (deficiente de 1^e) enquanto o último passo envolve a subsequente doação

de um segundo elétron ao composto II pelo substrato reduzido, devolvendo o LiP para o férrico oxidado, que indica a conclusão do ciclo de oxidação (FALADE et al., 2016).

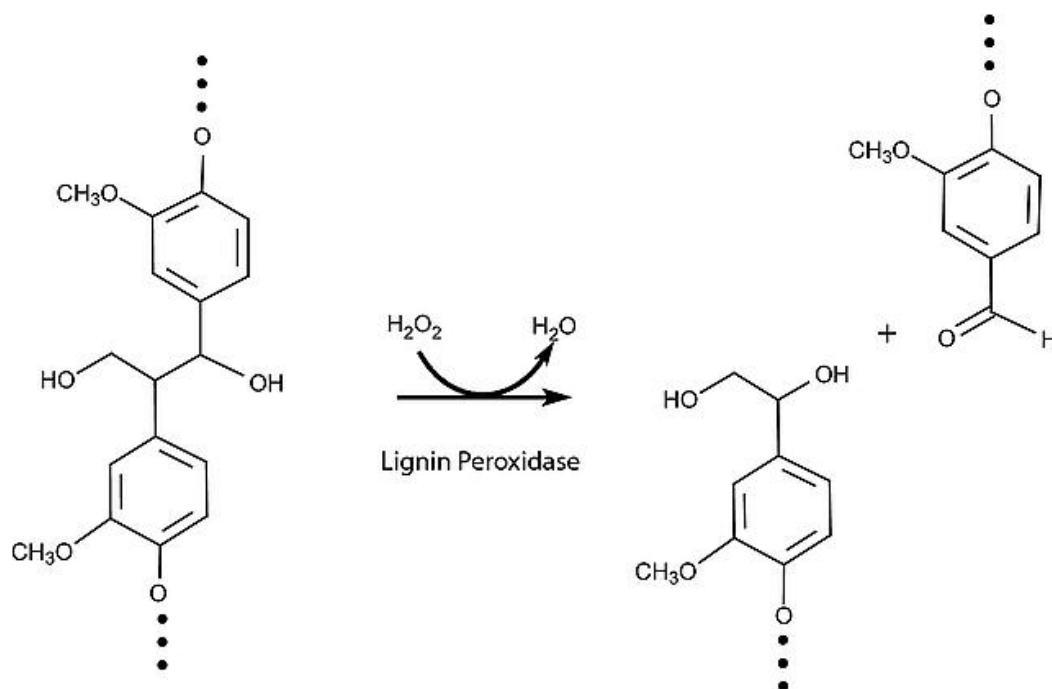


Figura 6 - Representação do mecanismo de ação da enzima lignina peroxidase (FRANSSEN et al., 2013).

1.4 Fungos filamentosos e enzimas com aplicação em biotecnologia

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

Além de exercerem importantes funções vitais em seus ecossistemas naturais, como recirculação da biomassa os fungos filamentosos representam recursos genéticos para aplicação em muitos processos e produtos biotecnológicos (NODVIG, 2015). As enzimas fúngicas são usadas em processos de fabricação em larga escala, incluindo produção de papel e celulose,

alimentos, bebidas, vinho, detergentes, indústria têxtil e biocombustíveis, sendo a maioria das enzimas utilizadas em todo o mundo produzidas por fungos filamentosos. Em 2016, o mercado global de enzimas industriais foi estimado em 4 bilhões de euros (NOVOZYMES, 2016). A diversidade metabólica dos fungos e a ampla gama de nichos ecológicos em que habitam significam que muitas espécies têm potencial significativo como fontes de novas enzimas para exploração (MEYER et al., 2016).

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

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

Os fungos filamentosos também apresentam metabolismo secundário, produzindo compostos como micotoxinas, que prejudicam, ou mesmo matam animais e humanos. Por exemplo, espécies do gênero *Aspergillus* produzem aflatoxinas carcinogênicas e os custos devido ao controle de micotoxinas em produtos agrícolas equivalem a vários bilhões de dólares por ano; outros metabolitos secundários incluem compostos medicamente relevantes, como antibióticos

(penicilina), imunossupressores (ácido micofenólico) (NODVIG, 2009), além de alcalóides, giberelinas, imunomoduladores, pigmentos e vitaminas (ADAV et al., 2012; DA SILVA et al., 2012; DELABONA et al., 2013; MANAVALAN et al., 2012; MARX et al., 2013; RIBEIRO et al., 2012). Assim, as coleções de culturas fúngicas constituem patrimônio genético de grande valor atualmente, no qual o desenvolvimento econômico e social sustenta-se, em grande parte, na biotecnologia. (DE MELLO, 2011).

A principal estratégia de bioprospecção adotada pelas empresas multinacionais consiste na busca desses microrganismos provenientes da maior diversidade de ambientes possível, obtendo amostras do solo, isolados de fungos e microorganismos associados a plantas e insetos, principalmente em regiões tropicais pouco exploradas (DE MELLO, 2011). Além do Brasil, diversos países do mundo vêm desenvolvendo estudos na área de prospecção de fungos e engenharia de enzimas. Os Estados Unidos iniciaram a execução do projeto *1000 Fungal Genome*, que agrega diversas instituições norte-americanas em torno do sequenciamento do DNA de 1000 espécies de fungos até 2016, justamente em função desses microrganismos serem de grande importância econômica e potencial aplicação biotecnológica (GRIGORIEV et al., 2014). O genoma de vários fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas já foi sequenciado nos últimos dez anos, permitindo estudos sistemáticos de seus sistemas enzimáticos. Com base no aumento de informações genômicas e proteômicas, novas enzimas foram identificadas (LIU et al., 2013).

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

A degradação da lignina é atribuída majoritariamente a espécies de fungos do filo *Basidiomycota*, sendo fenotipicamente divididos em três grupos: fungos da podridão branca, fungos da podridão marrom e fungos da podridão branca, que se diferenciam quanto a forma como degradam os diferentes componentes da lignocelulose, com fungos filamentosos do filo

Ascomycota sendo estudados apenas recentemente (HATAKA, 2015; JANUSZ, 2013). Ascomicetos em sua maioria são capazes de degradar celulose e hemicelulose, mas sua habilidade em degradar lignina tem sido pouco estudada. Fungos que degradam lignina de forma seletiva apresentam potenciais aplicações biotecnológicas, onde a remoção da lignina é necessária para a obtenção de celulose intacta e sua posterior utilização na indústria de papel, ração animal e biocombustíveis (DASHTBAN, 2010).

Porém, estudos recentes relatam a presença de genes de lacase em fungos filamentosos ascomicetos como *Phoma* sp. (JUNGHANS et al., 2009), *Fusarium oxysporum* (CANERO et al., 2008), *Aspergillus niger* (RAMOS et al., 2011) e *Aspergillus nidulans* (SCHERER, 2001). Um estudo feito por Bonugli-Santos et al., (2015) relatou diferentes espécies de fungos filamentosos provenientes de ambientes marinhos capazes de degradar corantes sintéticos e efluentes têxteis, além da degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Diferentes cepas marinhas identificadas como *Penicillium citrinum* CBMAI 853, *Aspergillus sulphureus* CBMAI849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI857 e *Trichoderma* sp. CBMAI852 foram capazes de degradar o corante têxtil RBBR, enquanto *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI849 foi capaz de degradar pireno e benzopireno, podendo estar relacionado a produção de enzimas oxidorreduzases lignolíticas, além da ação do sistema citocromo P-450 monooxigenase. Além disso, um estudo feito por Govarathan et al., (2017) relatou a produção de manganês peroxidase em *Penicillium* sp. CHY-2 e a degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos.

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

1.4.1 *Pestalotiopsis* sp.

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

O gênero *Pestalotiopsis* contém cerca de 205 espécies (Funindex, <http://194.131.255.3/cabipages/names/Names.asp>), muitas com o nome da planta hospedeira no qual foram observados pela primeira vez. A compreensão das relações de espécies dentro desse gênero fracamente parasítico, tem sido complicado devido à inadequação de caracteres morfológicos disponíveis para diferenciar espécies. Os conídios (esporos assexuais) são geralmente fusiformes, retos ou ligeiramente curvos, apresentando 3 ou 4 séptos. As células medianas são pigmentadas (ou concolor ou versicolor). Os apêndices apicais são principalmente filiformes, um a muitos (mais geralmente 2-3), ramificados ou não ramificados. Os apêndices basais de 4-9 µm são geralmente presentes e surgem de uma célula basal (JEEWON, 2006).

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

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

estudos deste organismo sugerem que ele tem potencial como organismo modelo para estudos biológicos e bioquímicos no laboratório (METZ et al., 2000).

Além disso, estudos realizados com *Pestalotiopsis* sp. NCI6, um fungo halotolerante e lignocelulolítico de manguezal envolvendo o sequenciamento e a montagem do seu transcriptoma indicam que este fungo possui mais de 400 enzimas lignocelulolíticas, incluindo uma grande fração envolvida na degradação da lignina (ARFI et al., 2013).

1.4.5 *Trichoderma reesei*

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

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

Por ser considerado um organismo seguro (não patógeno), *T. reesei* passou a ser utilizado na produção industrial de enzimas e como organismo modelo em estudos de expressão gênica e degradação de celulose (NEVALAINEN et al., 1994). Em particular, *T. reesei* se destaca por sua grande capacidade de produzir e secretar um sistema multienzimático, induzível de enzimas celulolíticas que podem ser produzidas industrialmente e utilizadas na degradação de biomassa vegetal para diversas aplicações, como produção de biocombustíveis, além do potencial

metabólico para a produção de importantes biomoléculas, como 1,4-ácidos dicarboxílicos (succínico, málico e fumárico), 3-ácido hidroxipropiônico, glicerol, sorbitol, xilitol e hidroxibutirolactona, atualmente obtidos de derivados do petróleo.

O sistema de celulases de *T. reesei* (MONTECOURT, 1983) é provavelmente um dos mais extensivamente estudados em seus diversos aspectos, tais como mecanismos de ação das celulases e regulação da expressão de seus genes (ABRANHÃO-NETO et al., 1995; CARLE-URIESTE et al., 1997; EL-DORRY et al., 1996; EL-GOGARY et al., 1989; HENRIQUE-SILVA et al., 1996). O sistema celulolítico de *T. reesei* consiste, em geral, de duas classes de enzimas: endoglucanases (EGI/Cel7B, EGII/Cel5A, EGIII/Cel2A, EGIV/Cel61A e EGV/Cel45A) e exoglucanases (celobiohidrolases: CBHI/Cel7A e CBHII/Cel6A), que agem sinergicamente, clivando ao acaso, as ligações β -glicosídicas da cadeia celulósica, liberando unidades de celobiose (glicosil-1,4-glicose). Duas enzimas β -glicosidases (BGLI/Cel3A e BGLII/Cel1A) clivam celobiose a glicose. As quatro enzimas celulases mais abundantes (CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B e EGII/Cel5A) constituem mais de 50% da proteína secretada em condições de indução (FOREMAN et al., 2003).

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

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

1.5 Sacarificação da lignocelulose e coquetéis enzimáticos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

V Conclusões

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

Desse modo, podemos concluir:

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KURAWARA, M; et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS**, v.169, n°2, 1984.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- RIZK, M; et al. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 428, 1–5, 2012.
- SAJEEWA, S; et al. Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal diversity**, v. 50, 167-187, 2011.
- SAKURAI, T; KATAOKA, K. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. **The Chemical Record**, v. 4, 220-229, 2007.
- SALVACHÚA, D; et al. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, 7500-7506, 2011.
- SAMBROOK, J; et al. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- SAMUELS, G. J. Trichoderma: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n°2, 195-206, 2006.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, 185-194, 2009.
- SANCHEZ, O; et al. Delignification Process of Agro-Industrial Wastes an Alternative to Obtain Fermentable Carbohydrates for Producing Fuel. **Environmental sciences**, 2011.
- SARITHA, M; et al. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. **Indian J Microbiol**, v. 52, 122-130, 2012.
- SARTORI, T; et al. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using *Trichoderma viride*. **BioMed Research International**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/342716>
- SCHERER, M; et al. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology letters**. v. 30, n°2, 207-213, 2001.
- SCHMIDT, O; Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection, and Use, Chapter 3: Physiology Berlin; New York: Springer, 2006.
- SHARMA, D; et al. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D.Don. **3 Biotech**, 6:210, 2016.

- SLOMCZYNSKI, D; et al. Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, 907-912. 1995.
- SOYGUN, K; et al. Investigation of Mechanical and Structural Properties of Blend Lignin-PMMA. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2013, 2013.
- SQUINA, F. M; et al. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. *PLoS One*, v. 7, 2012. e50571
- STROBEL, G; et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, na endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, v. 142, 435-440, 1996.
- SUM, J; et al. Deciphering Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated with Hemicellulose Degradation in *Neurospora crassa*. **Eucaryotic Cell**, 482-493, 2012.
- SZCZERBOWSKI, D; et al. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrates Polymers**, v. 114, 95-101, 2014.
- TANG, P; et al. Production of Monomeric Aromatic Compounds from Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber Lignin by Chemical and Enzymatic Methods. **BioMed Research International**, v. 15, ID 891539, 2015.
- THAKUR, V. K; et al. Review: Raw Natural Fiber–Based Polymer Composites. **International journal of Polymer Analysis and characterization**, v. 19, 2014.
- TIEN, M; KIRK, T. K. Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**, v. 12, n° 221, (4611):661-3, 1983.
- TIEN, M.; KIRK, T. K; Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In-Methods in Enzymology, Biomass Part B: Lignin, Pectin, and Chitin. eds.Wood, W.A., Kellogg, S.T. USA, **Elsevier**, v. 161, 238-249, 1988.
- VARES, T; et al. Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat Straw. **Applied and environmental microbiology**, 3515–3520, 1995.
- VALENCIA, E.Y; CHAMBERGO, F. S; Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics Biology**, v. 60, 9-18, 2013.
- VAN DEN BRINK, J; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, 1477–1492, 2011.

- VILGAYS, R; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n° 8, 4238-4246, 1990.
- WAN, C; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 30, 1447–1457, 2012.
- WANG, F; et al. Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, 572-578, 2013.
- WANG, X; et al . Genomic and transcriptomic analysis of the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici* reveals its lifestyle and high potential for synthesis of natural products. **BMC genomics**, 16-28, 2010.
- WHITE, T. J; et al, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics, 1990.
- Woolridge, E. M. Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass. **Catalysts**, v. 4, 1-35, 2014.
- WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends Biotechnology**, v. 25, 153-157, 2007.
- XU, J; et al. Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. **Fungal Diversity**, v. 66, 37–68, 2014.
- YANG, L; et al. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Natural Product Reports**, v. 29, n° 6, 622-641, 2012.
- ZVIELY, 2013 - Converting Lignocellulosic Biomass to Low Cost Fermentable Sugars. **Green Energy and Technology**, Ed. Fang, Zhen, Springer, 2013
- ZHANG, Y. H; HONG, J. Y. X. **Cellulase assays**. **Methods in Molecular Biology**. v. 581, 213-231, 2009.
- ZHANG, Y. J; et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n°1, 114-118, 2010.