

LUIZ VINÍCIUS DE SOUZA ARRUDA

**AVALIAÇÃO DO EXOPROTEOMA DE *Talaromyces pinophilus* CULTIVADO EM
CASCA DE SOJA E PRODUÇÃO DE α -ARABINOFURANOSIDASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Valéria Monteze Guimarães

Coorientador: Túlio Morgan

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A779a
2023 Arruda, Luiz Vinicius de Souza, 1998-
Avaliação do exoproteoma de *Talaromyces pinophilus* cultivado
em casca de soja e produção de α -arabinofuranosidase / Luiz Vinicius
de Souza Arruda. - Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (82 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Referências bibliográficas: f. 67-82.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.295>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Alfa-L-arabinofuranosidase. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Cascas
de soja. 4. *Talaromyces pinophilus*. I. Guimarães, Valéria Monteze,
1961-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.76

LUIZ VINÍCIUS DE SOUZA ARRUDA

AVALIAÇÃO DO EXOPROTEOMA DE *Talaromyces pinophilus* CULTIVADO EM CASCA DE SOJA E PRODUÇÃO DE α -ARABINOFURANOSIDASE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente
LUIZ VINICIUS DE SOUZA ARRUDA
Data: 23/05/2023 16:11:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Luiz Vinícius de Souza Arruda
Autor



Documento assinado digitalmente
VALERIA MONTEZE GUIMARAES
Data: 24/05/2023 08:43:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Valéria Monteze Guimarães
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, José Luiz e Mônica, por todo incentivo a seguir o que caminho que escolhi, por me encorajar a encarar os desafios de cabeça erguida, sem pensar em desistir. O apoio de vocês e a vontade de os proporcionar uma vida melhor foram fundamentais pra sustentar a minha luta.

Aos meus irmãos, Felipe e Nathália, que nunca deixaram de me apoiar, que sempre me ajudaram da forma que conseguiam, que sacrificaram do próprio conforto para ajudar a me manter na Universidade. Pelo companheirismo, pelos conselhos, pela abertura aos desabafos e pela vontade de me ver alcançar os meus objetivos. Por serem definitivos na minha jornada.

À minha orientadora Profa. Valéria Monteze Guimarães, que sempre acreditou de mim, às vezes mais do que eu mesmo. Por todas as conversas extremamente enriquecedoras, por seu lado humano e empático, por sempre chamar atenção para o que pode ser melhorado, sem nunca me desrespeitar como pessoa ou desconsiderar os meus limites. Por seu lado carinhoso, inteligente, criterioso e amigável. Por me incentivar a crescer e melhorar, por destacar as minhas qualidades e limitações, por fornecer um ambiente de trabalho que me faça sentir valorizado. Por lutar por uma educação justa e pelo acesso de todos à Universidade. Pelas confraternizações sempre muito divertidas. Poucas pessoas possuem o privilégio de ser orientado por alguém tão especial.

Ao Túlio, que foi essencial para a execução do meu trabalho, que me ensinou e auxiliou em todas as análises de bioinformática e dos dados de espectrometria. Ao Murillo, que pôde contribuir às discussões e às análises, mesmo que distante.

Aos meus amigos de laboratório, Riziane, Rafaela, Lucas, Jean, Lilian, Débora, Micael, Samara, Carlos, Isabel, Letícia e Mariana por toda a ajuda e conversas produtivas. Trabalhar em um ambiente com pessoas tão prestativas e divertidas faz toda a diferença para a minha rotina.

À Jhenifer, que foi estagiária do LABQ e me ajudou em vários experimentos, desde os que deram errado até os que deram muito certo, que ia ao laboratório até nos horários mais adversos e que “quebrava a cabeça” junto comigo para encontrar sentido nos resultados. Agradeço ao companheirismo e à paciência.

Aos meus amigos da antiga república, Bruno, Daniel, Vinícius e Célio, que me proporcionaram uma experiência incrível como morador de Viçosa, que marcaram o período de graduação e mestrado com momentos icônicos e inesquecíveis. Ao meu amigo de apartamento Jonatas, que já tenho mais de 20 anos de amizade, que sempre me incentivou e ajudou de várias formas possíveis e que se desdobrou para resolver imprevistos, muitas vezes sozinho, enquanto eu passava por um período muito estressante no término do mestrado. Um agradecimento especial pela sua compreensão e empatia.

Aos meus amigos de infância, que mesmo distantes se fizeram presentes na minha jornada e me forneceram apoio emocional antes, durante e após a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, pela oportunidade de fazer o curso de Mestrado em Bioquímica Aplicada. Ao BIOAGRO e todo seu corpo de funcionários, pela estrutura proporcionada para a realização do meu trabalho. À CAPES, pela bolsa de mestrado. À Universidade Federal de Viçosa, pelo ambiente lindo, diverso e bem estruturado que permitiu a minha formação de qualidade.

Finalmente, ao presidente Lula e à ex-presidenta Dilma, pela implementação da política de cotas e pelo investimento na educação pública e nas políticas afirmativas para a manutenção de estudantes de baixa renda na Universidade. Eu, como antigo morador do alojamento e antigo beneficiário da bolsa alimentação, não conseguiria me manter na Universidade sem a existência desses auxílios.

RESUMO

ARRUDA, Luiz Vinícius de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Avaliação do exoproteoma de *Talaromyces pinophilus* cultivado em casca de soja e produção de α -arabinofuranosidase.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Coorientador: Túlio Morgan.

Atualmente, o Brasil é uma potência mundial na produção e exportação de soja, gerando também grandes quantidades de resíduos a partir do seu processamento, sendo um deles a casca de soja, que é rica em carboidratos, proteínas e possui baixo teor de lignina. Foi observado que o cultivo do fungo fitopatogênico *Talaromyces pinophilus* nesta biomassa induz a produção de enzimas de interesse biotecnológico. Nesse sentido, o extrato bruto de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja sob fermentação submersa foi analisado por LC-MS/MS para a identificação das proteínas mais abundantes. A análise do secretoma experimental mostrou que, nessas condições, o fungo produz elevadas quantidades de α -L-arabinofuranosidase da família GH54. Após o estudo secretoma experimental de *T. pinophilus*, essas informações foram comparadas aos dados de predição de CAZymes potencialmente secretadas pelo mesmo fungo, gerado por ferramentas preditivas baseadas em seu genoma. Esses resultados confirmaram que a casca de soja induz a produção de uma grande diversidade de arabinofuranosidases, além de direcionar o metabolismo do fungo para a produção de uma α -L-arabinofuranosidase da família GH54 em alta abundância. A partir deste princípio, a enzima foi produzida e parcialmente purificada por ultrafiltração e cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose. A enzima demonstrou ter massa molecular próxima a 52 kDa, exibiu maior atividade em pH 4,5 a 60 °C e $t_{1/2}$ de aproximadamente 55h quando incubada a 50 °C. A enzima também demonstrou ser modulada positivamente na presença de Co^{2+} , Mn^{2+} , EDTA e Tween 80 e apresentou um caráter bifuncional, exibindo atividade de α -arabinofuranosidase e β -galactosidase. Por fim, a α -L-arabinofuranosidase da família GH54 demonstrou um efeito positivo na sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado quando adicionada a um coquetel enzimático celulolítico, acarretando no aumento da liberação de glicose, xilose e arabinose, bem como na conversão de celulose e hemicelulose em seus respectivos açúcares monoméricos.

Palavras-chave: α -L-Arabinofuranosidase. Exoproteoma. Casca de soja. *Talaromyces pinophilus*.

ABSTRACT

ARRUDA, Luiz Vinícius de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2023. **Evaluation of the exoproteome of *Talaromyces pinophilus* cultivated in soybean hulls and α -arabinofuranosidase production.** Advisor: Valéria Monteze Guimarães. Co-advisor: Túlio Morgan.

Brazil is one of the countries that most produces and exports soybeans in the world. Industrial processing of soybeans generates a large amount of waste, one of which is soybean hulls, that is rich in carbohydrates and proteins. The endophytic fungus *Talaromyces pinophilus* grown in soybean hulls was able to produce several enzymes of biotechnological interest. The objectives of the present work are to identify the CAZymes of the exoproteome of *T. pinophilus* cultivated in soybean hulls and characterize the most abundantly secreted enzyme. The crude extract of *T. pinophilus* grown in soybean hulls under submerged fermentation was analyzed by LC-MS/MS. An α -arabinofuranosidase from the GH54 family was most abundantly secreted. This enzyme was partially purified by ultrafiltration and ion exchange chromatography, biochemically characterized and applied in the saccharification of lignocellulosic biomass. Comparison of the predicted *T. pinophilus* secretome with the experimental exoproteome of this fungus revealed that soybean hulls were able to induce a wide spectrum of CAZymes and especially a wide range of arabinofuranosidases. Among these, a single α -L-arabinofuranosidase GH54 stood out for its high abundance. This purified α -L-arabinofuranosidase showed MM close to 52 kDa, higher activity at pH 4.5 at 60 °C and $t_{1/2}$ of approximately 55h at 50 °C. The enzyme was positively modulated by Mg^{2+} , EDTA and Tween 80 and showed a bifunctional character, exhibiting α -arabinofuranosidase and β -galactosidase activities. Supplementation of a commercial cellulolytic enzyme cocktail with α -L-arabinofuranosidase promoted a positive effect on the saccharification of pretreated sugarcane bagasse, increasing the release of glucose, xylose and arabinose. *T. pinophilus* is a promising fungus for the production of lignocellulolytic enzymes, especially an α -L-arabinofuranosidase GH54, which proved to be efficient in supplementing commercial enzyme mixtures intended for biomass degradation.

Keywords: α -L-Arabinofuranosidase. Exoproteome. Soybean hulls. *Talaromyces pinophilus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Biomassa lignocelulósica	10
2.2 Estudo do exoproteoma de fungos filamentosos.....	17
2.3 O fungo <i>Talaromyces pinophilus</i>	20
2.4 Arabinofuranosidases	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Microrganismo e materiais.....	24
4.2 Caracterização centesimal da casca de soja	25
4.3 Obtenção e análise do secretoma experimental.....	26
4.3.1 Preparação da amostra e digestão tríptica em gel.....	26
4.3.2 Identificação dos peptídeos trípticos	27
4.4 Predição de CAZymes extracelulares baseada no genoma de <i>T. pinophilus</i>	28
4.5 Identificação molecular do microrganismo.....	29
4.6 Cultivo do fungo e produção de enzimas	30
4.7 Dosagem de proteínas e ensaios enzimáticos.....	30
4.8 Purificação.....	32
4.9 SDS-PAGE.....	33
4.10 Caracterização bioquímica	34
4.11 Aplicação da α -ABF na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ..	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Análise do secretoma experimental.....	37
5.2 Predição de CAZymes extracelulares baseada no genoma de <i>T. pinophilus</i>	46
5.3 Identificação molecular	53
5.4 Purificação da α -ABF da família GH54 de <i>T. pinophilus</i>	54
5.5 Caracterização bioquímica	59
5.6 Efeitos da α -ABF na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado	63
6. CONCLUSÕES GERAIS	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

Com o advento da inovação tecnológica e o avanço das ferramentas de bioinformática, iniciou-se, desde o início do milênio, uma explosão de estudos voltados para as “ômicas”, que revolucionou a ciência ao permitir o processamento de grandes volumes de dados com baixo consumo de tempo (BOJA et al., 2014). A proteômica, segmento que pode ser definido como o estudo sistemático da estrutura, função, interação e composição das proteínas e suas atividades celulares (WILKINS et al., 1996), possibilitou importantes descobertas no estudo de peptídeos, proteínas e enzimas. Com a existência de *softwares* que permitem desde a modelagem de proteínas por homologia até a predição de suas características físico-químicas, baseando-se em sequências e estruturas similares depositadas em bancos de dados, fica claro que o domínio dessas abordagens contribui para a melhoria de processos que envolvem a participação de peptídeos, proteínas e enzimas.

O mercado de enzimas, em alta na última década, apresenta acréscimos anuais em sua receita à medida que indústrias de diferentes setores vêm adotando o uso dessas biomoléculas em seus processos. As enzimas são catalisadores biológicos que permitem o controle eficiente dos processos aos quais estão envolvidas, por apresentarem vantagens como alta especificidade de reação, possibilidade de reutilização quando imobilizadas, altos rendimentos de produtos e baixo custo para a recuperação dos mesmos, além de serem ambientalmente amigáveis, características que não são destaque nos catalisadores químicos. Em contrapartida, o custo de produção e o escalonamento de processos industriais que empreguem essas biomoléculas se mostram como os principais gargalos de sua utilização (BIBI et al., 2021). As CAZymes, enzimas que atuam especificamente em carboidratos, destacam-se por serem muito versáteis, sendo aplicadas no processamento de alimentos, suplementação de alimentos para animais, indústria têxtil, produção de biocombustíveis, formulação de detergentes, dentre outros (CONTESINI et al., 2013; CORRÊA et al., 2020). As CAZymes que atuam no complexo lignocelulósico, especialmente atrativas para a produção de bioetanol, representam mais de 20% das enzimas comercializadas no mundo (TOUSHIK et al., 2017).

Fungos filamentosos, bactérias e leveduras apresentam-se como as maiores fontes para a produção de enzimas devido a uma série de vantagens frente a outros organismos, que incluem a produção independente de fatores sazonais, rendimentos elevados e baixos requerimentos nutricionais para o crescimento dos microrganismos (RAVEENDRAN et al., 2018). Fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são descritos na literatura como bons produtores de enzimas de degradação de parede celular, dentre elas as CAZymes de

interesse biotecnológico (MÄKELÄ; DONOFRIO; DE VRIES, 2014). De forma mais generalizada, fungos fitopatogênicos podem ser ótimas fontes de celulases, hemicelulases e outras enzimas auxiliares, sendo esse maquinário enzimático necessário para degradar a barreira de defesa primária das células vegetais, a parede celular, e assim, permitir a invasão desses patógenos às células hospedeiras (KUBICEK; STARR; GLASS, 2014). Fatores condicionais de cultivo como a fonte de carbono utilizada, tempo de crescimento e condições de temperatura e agitação influenciam diretamente no perfil de enzimas secretadas por esses microrganismos (JUN; KIESELBACH; JÖNSSON, 2011).

O fungo fitopatogênico *Talaromyces pinophilus* teve seu genoma sequenciado e seu proteoma predito em um trabalho recente, em que foi evidenciado o seu potencial para a produção de 803 CAZymes, incluindo xilanases, β -galactosidases, α -amilases, arabinofuranosidases, pectinases e outras (LI et al., 2017). Uma vez que o conjunto de proteínas produzidas por um fungo é modulado pelas suas condições de cultivo, incluindo a fonte de carbono utilizada, faz-se necessário avaliar diferentes condições para definir aquelas que melhor direcionam a produção e secreção de enzimas de interesse biotecnológico. O cultivo de fungos em resíduos lignocelulósicos de baixo custo, como a casca de soja, é vantajoso sob o ponto de vista industrial, por promover a redução do custo de produção das enzimas e consequentemente do processo no qual essas enzimas são utilizadas. A análise prévia do secretoma de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja revelou que, nessas condições, o fungo direciona o seu metabolismo de proteínas para a produção de altos níveis de α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55).

As α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) são enzimas que atuam na hidrólise de ligações glicosídicas do tipo α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,5) em resíduos de L-arabinofuranose ligados a oligo/polissacarídeos complexos, como a arabinoxilana e arabinogalactana (BOURAOUI et al., 2016). As α -L-arabinofuranosidases desempenham papéis fundamentais na indústria, como na formulação de coquetéis enzimáticos para a sacarificação de biomassas lignocelulósicas, na suplementação de alimentos para aumento de sua digestibilidade e na deslignificação da polpa na indústria de papel (BINOD et al., 2019; NUMAN; BHOSLE, 2006a; PORIA et al., 2020a).

Nesse trabalho, analisamos o exoproteoma de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja, especialmente em relação à produção de CAZymes de interesse biotecnológico. Além disso, visto que α -L-arabinofuranosidases foram abundantemente expressas pelo fungo cultivado nessas condições, foi realizada a purificação, caracterização e aplicação da α -L-arabinofuranosidase na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa vegetal lignocelulósica é a matéria natural mais abundante do planeta. É constituída principalmente por celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas e a composição relativa desses elementos varia de acordo com a fonte (figura 1). Essas concentrações dependem da espécie vegetal, da localização do tecido, condições de crescimento e da idade da planta (SINGHVI; DIGAMBAR; GOKHALE, 2019).

As fibras que compõem a biomassa lignocelulósica se envolvem em uma matriz complexa que confere proteção à célula vegetal. Essa forte associação resulta em um complexo recalcitrante à degradação enzimática, o que se caracteriza como um obstáculo para o aproveitamento industrial e biotecnológico desse material (ZOGHLAMI; PAËS, 2019).

As principais fontes de biomassa lignocelulósica são as algas marinhas, resíduos agroindustriais, descartes sólidos urbanos e matérias-primas florestais (VASIĆ; KNEZ; LEITGEB, 2021). O Brasil se encontra entre as maiores potências mundiais na exportação de produtos agrícolas. Ao mesmo tempo que exista tamanha produtividade, ocorre a formação de resíduos agrícolas em grande abundância que, quando indevidamente descartados, acarretam em impactos ambientais. O aprimoramento de técnicas que permitam, de forma eficiente, desconstruir o material lignocelulósico e transformar seus componentes de degradação em produtos biotecnológicos irá não somente reduzir os impactos ambientais gerados pelo acúmulo desses subprodutos, como também permitirá a criação de novas mercadorias com valor agregado.

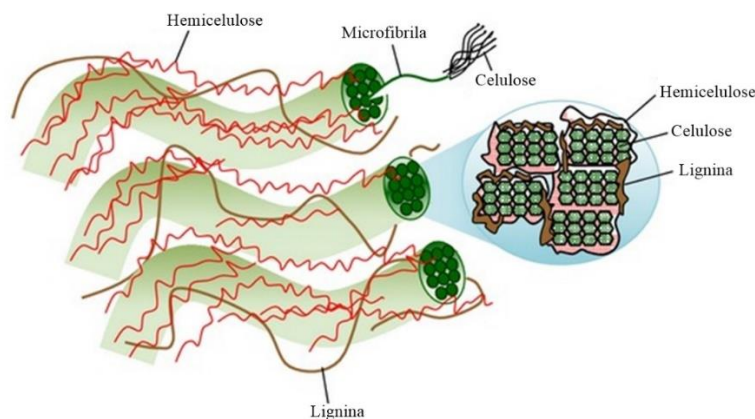


Figura 1: esquema do complexo lignocelulósico. Adaptado de Zain, et al (2014).

2.1.1 Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da biosfera. A cadeia principal da celulose, ou cada microfibrila, consiste em um homopolissacarídeo formado por unidades de D-glicose ligadas umas às outras por ligações β -1,4 (figura 2). Microfibrilas adjacentes interagem com cadeias vizinhas por meio de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, estabelecendo uma rede de interações que confere ainda mais resistência ao polímero. Além disso, a celulose é um material renovável, biodegradável e atóxico (LUCIA; AYOUB, 2018).

A associação de microfibrilas, as fibrilas, possuem regiões cristalinas e amorfas. As regiões onde se tem maior interação entre as microfibrilas são denominadas cristalinas e são mais dificilmente hidrolisáveis em virtude do caráter estável da matriz que se encontra mais fortemente associada. As regiões em que as microfibrilas encontram-se menos fortemente associadas são chamadas de amorfas e são hidrolisadas mais facilmente que as regiões cristalinas, devido ao fato de a matriz estar mais disponível para ser acessada por processos enzimáticos, químicos ou mecânicos. A hidrólise da celulose libera glico-oligossacarídeos como celobiose, celotriose, celotetose, dentre outros, sendo todos eles constituídos por unidades de D-glicose ligadas umas às outras (THOMAS et al., 2018).

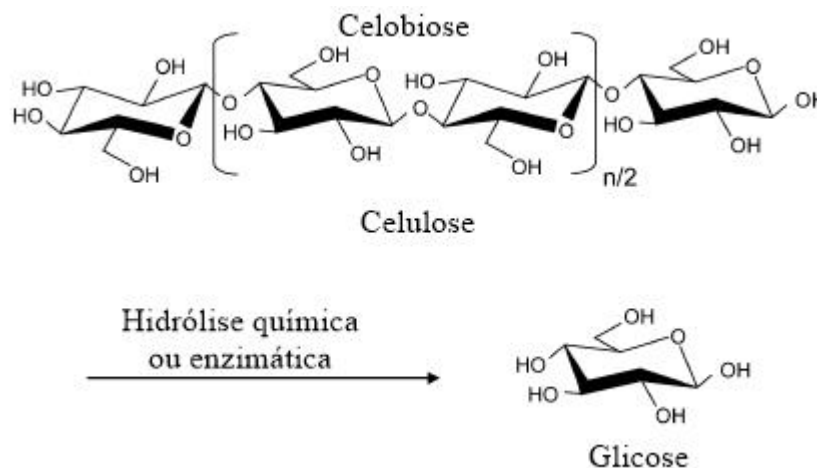


Figura 2: Estrutura da celulose com destaque para unidade de celobiose (Adaptado de ONDA; OCHI; YANAGISAWA, 2008).

A degradação completa da celulose é um desafio devido ao caráter recalcitrante da biomassa lignocelulósica, que restringe o acesso de enzimas celulolíticas aos seus respectivos substratos (ZOGHLAMI; PAËS, 2019). As enzimas fúngicas de degradação de celulose são distribuídas principalmente nas famílias GH3, GH5, GH6, GH7 e GH61. As endo-1,4- β -

glucanases (GH5) clivam ligações no interior da cadeia, as exo-1,4- β -glucanases ou cellobiohidrolases (GH6 e GH7) clivam ligações nas extremidades redutora e não redutora e liberam moléculas de celobiose e as β -glicosidases (GH3) hidrolisam a celobiose em unidades de D-glicose. Uma classe de enzimas da família GH61 dependentes de cobre, as polissacarídeo mono-oxigenases (PMOs), também atuam na degradação da celulose catalisando uma clivagem oxidativa na presença de um doador de elétrons (LOUISE GLASS et al., 2013).

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta. Sua estrutura destoa da celulose pelo extenso grau de ramificação e variação na composição de suas unidades monoméricas. Consiste em um heteropolissacarídeo constituído por hexoses (como glicose, galactose e manose), pentoses (como xilose, arabinose e ramnose), ácidos urônicos (como ácido glicurônico) e grupos acetil. O grau de substituição e a composição das cadeias de hemicelulose variam dependendo da espécie (WANG et al., 2021).

As cadeias da hemicelulose são muito menores e possuem menor grau de polimerização que a celulose, mas podem apresentar elevado número de grupos substituintes (ZOGHLAMI; PAËS, 2019). A hemicelulose é totalmente amorfa e possui pouca resistência mecânica, o que a torna facilmente hidrolisável e suscetível à ação enzimática ou química (ISIKGOR; BECER, 2015). Por estar associada às fibras de celulose, a hemicelulose atua como uma barreira física que limita o acesso das celulasas aos seus substratos. Muitos estudos já demonstraram que a remoção da hemicelulose contribui para a acessibilidade de enzimas à celulose (SANTOS et al., 2018). Acredita-se que a hemicelulose se associa à celulose por meio de ligações de hidrogênio e se associa à lignina principalmente por meio de ligações covalentes (SINGH; CHANDEL, 2018).

Por ter uma estrutura tão complexa e heterogênea, a degradação completa da hemicelulose depende da ação conjunta de um arsenal enzimático que atue de maneira cooperativa na liberação dos seus monossacarídeos e grupos substituintes (figura 3). A maior fração da hemicelulose é representada por xilana substituída com arabinose, ácido glicurônico ou hexoses (BASTAWDE, 1992). Dentre as enzimas necessárias para a degradação de xilana pode-se citar as endo- β -1,4-xilanases (GH10, GH11), α -L-arabinofuranosidases (GH3, GH10, GH43, GH51, GH54 e GH62), β -xilosidases (GH43 e GH3), acetilxilana esterases (CE1-CE7) e ácido ferúlico esterases (CE1) (LOUISE GLASS et al., 2013).

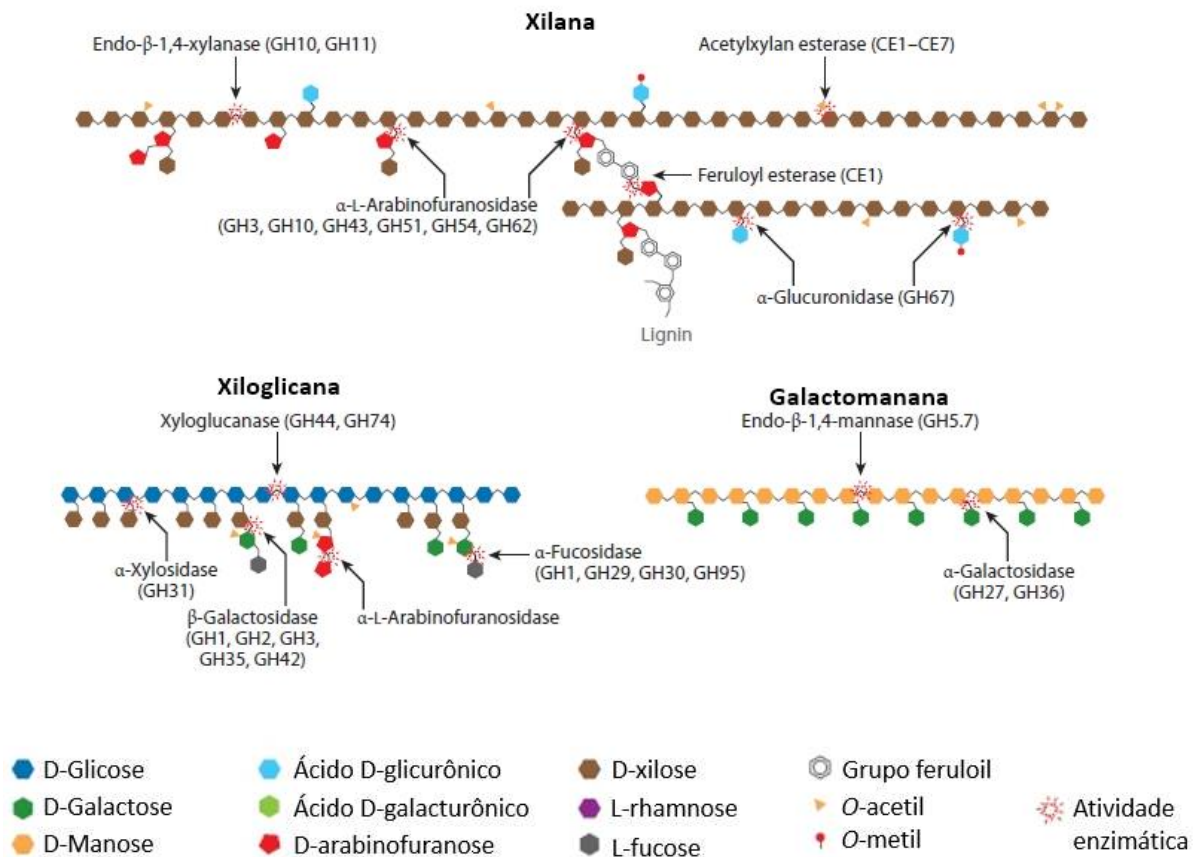


Figura 3: Enzimas envolvidas na hidrólise da hemicelulose (adaptado de LOUSE GLASS, et al. 2013).

2.1.3 Lignina

A lignina é um polímero aromático insolúvel que intercala as fibras de celulose e hemicelulose e representa de 10-25% da massa do complexo lignocelulósico. Sendo constituída por unidades de fenil propano altamente heterogêneas (figura 4), seus produtos de degradação não geram açúcares fermentescíveis e interferem negativamente em alguns processos industriais, como a sacarificação e o crescimento microbiano (RAJESH BANU et al., 2018). A lignina é o biopolímero fenólico mais abundante da Terra, tendo potencial para ser tratada como matéria-prima para a produção de energia e compostos químicos aromáticos (UPTON; KASKO, 2016).

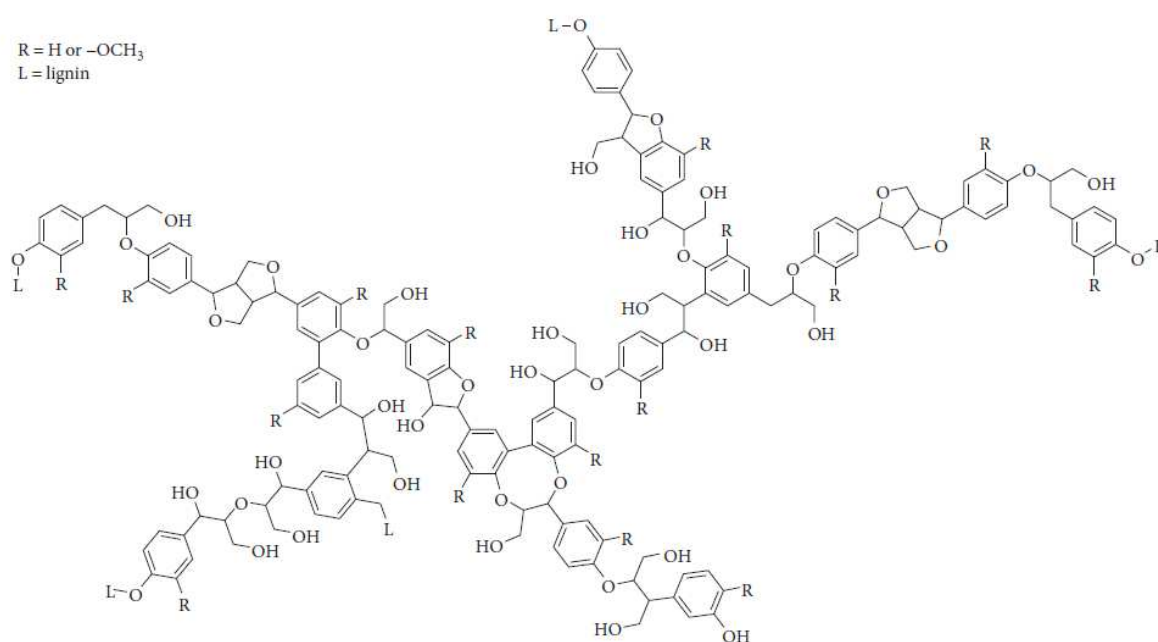


Figura 4: modelo estrutural da lignina proposto por Lu et al. (2017).

O teor de lignina varia entre espécies vegetais, idade e tecido. Em madeiras macias, a lignina representa em torno de 24-33% do seu peso seco; em madeiras duras, esse teor está em torno de 19-28%; e em gramíneas, 15-25% (LU et al., 2017). Dentre as tecnologias modernas para a elucidação da estrutura da lignina, pode-se citar a espectroscopia e espalhamento Raman confocal (ZENG; HIMMEL; DING, 2012) e espectrometria de massas de íons secundários (ZHOU et al., 2011), no entanto essas técnicas podem conduzir a interpretações ambíguas sobre os mecanismos de biossíntese e degradação. A quantificação de lignina em biomassas lignocelulósicas, por sua vez, pode ser feita por microscopia UV e gravimetria para a determinação dos seus teores solúveis e insolúveis, respectivamente, após hidrólise ácida (SLUITER et al., 2008).

Em alguns processos industriais que envolvam a sacarificação de biomassas lignocelulósicas, como a produção de bioetanol, a remoção da lignina é necessária, pois ela impede fisicamente o acesso de enzimas às fibras de celulose e hemicelulose, além formar ligações improdutivas com as mesmas, reduzindo significativamente o rendimento de hidrólise (SIQUEIRA et al., 2017). A indústria de papel e polpa kraft representa um dos setores mais significativos na produção de lignina residual, no chamado licor negro, mas a maior parte desse subproduto é indevidamente descartado ou queimado como combustível de baixo valor energético, resultando na subutilização dessa fonte de recursos aromáticos que pode ser utilizada para a geração de produtos biotecnológicos diversos (STEWART, 2008).

Os produtos de degradação da lignina podem ser usados para a construção de produtos químicos como ácidos orgânicos (vinílico, benzoico, tolueno, acético, metoxibenzoico e fórmico), dimetilsulfóxido e hidrocarbonetos aromáticos (UPTON; KASKO, 2016). A lignina também possui aplicações médicas, podendo ser utilizada como material para a fabricação de hidrogéis tridimensionais, devido às suas propriedades antioxidantes e antibacterianas, além da grande resistência mecânica (ASINA et al., 2017). Na indústria farmacêutica, compostos derivados da lignina são utilizados não somente para aliviar sintomas de algumas doenças, como também podem ser usados como compartimentos para drogas (YU; KIM, 2020). Mais recentemente, foi descoberto que a mistura de lignina com materiais plásticos para a impressão 3D atribui vantagens econômicas ao processo, além de garantir boa qualidade na estrutura dos materiais produzidos e tornar o processo mais ambientalmente amigável (NGUYEN et al., 2018; NGUYEN; BOWLAND; NASKAR, 2018).

2.1.4 Pectina

A pectina é um componente da parede celular primária e lamela média de células vegetais e de alguns microrganismos. Consiste em um heteropolissacarídeo de alta complexidade estrutural, constituído principalmente por ácido poligalacturônico com grupos substituintes diversos, sendo esses de cadeias curtas ou longas, compostas por mais de 17 tipos de monossacarídeos diferentes, ou ainda metoxilados ou acetilados (CANTERI et al., 2012; PARAMESWARAN; VARJANI; RAVEENDRAN, 2019).

O principal componente monomérico da pectina é o ácido galacturônico, que constitui aproximadamente 70% de sua estrutura, estabelecendo ligações glicosídicas nas posições *O*-1 e *O*-4 para a formação dos polissacarídeos pécticos. O polissacarídeo mais abundante da pectina é a homogalacturonana (HG), que apresenta unidades de ácido α -D-galactopiranosilurônico em ligações 1 \rightarrow 4 em cadeia linear. Outros elementos estruturais comumente encontrados na pectina (figura 5) são ramnogalacturonana I (RG-I), ramnogalacturonana II (RG-II) e xilogalacturonana (XGA), arabinogalactana I (ARA-I) e arabinogalactana II (ARA-II) – sendo este último associado a proteínas (Tabela 1). (MOHNEN, 2008; VILLA-RIVERA et al., 2021).

Tabela 1: elementos estruturais presentes na pectina (CANTERI et al., 2012; MOHNEN, 2008; VILLA-RIVERA et al., 2021).

Polissacarídeo	Características estruturais
Homogalacturonana (HG)	Constitui aproximadamente 65% da pectina. HG é parcialmente metilesterificado na carboxila C-6, pode ser

	<i>O</i> -acetilado em <i>O</i> -2 ou <i>O</i> -3 e pode conter outros ésteres de ligação cruzada.
Ramnogalacturonana I (RG-I)	Representa 20-35% da pectina. Contém um esqueleto de unidades do dissacarídeo [$-\alpha$ -D-GalA-1,2- α -L-Rha-1-4] $_n$ que se repete n vezes. É um polissacarídeo muito heterogêneo, sendo o comprimento da cadeia principal e os grupos substituintes muito variáveis.
Ramnogalacturonana I (RG-II)	Constitui aproximadamente 10% da pectina e é possivelmente o polissacarídeo mais complexo. Conservada na maioria das espécies vegetais, possui um esqueleto de pelo menos 8 resíduos de α -D-GalA com cadeias laterais constituídas por mais de 12 tipos diferentes de açúcares em mais de 20 tipos diferentes de ligações glicosídicas.
Xilogalacturonana (XGA)	Possui uma cadeia principal de homogalacturonana substituída com resíduos de D-xilose na posição <i>C</i> -3. O grau de xilosidação varia em diferentes vegetais. Os grupos laterais de xilose podem ser substituídos com outros resíduos de xilose ligados na posição <i>O</i> -4.
Arabinogalactana I (ARA-I)	Também denominado arabino-4-galactana, possui uma cadeia principal de galactopiranosos unidos por ligação β -1,4 e ramificadas com grupos arabinofuranosil unidos à cadeia por ligação α -1,3.
Arabinogalactana I (ARA-II)	Também denominado arabino-3,6-galactana, possui uma cadeia principal de galactopiranosos unidos por ligação β -1,3 e ramificadas na posição <i>C</i> (<i>O</i>)-6 com uma grande diversidade de monossacarídeos. Encontra-se associada com proteínas (arabinogalactanas-proteínas, AGPs).

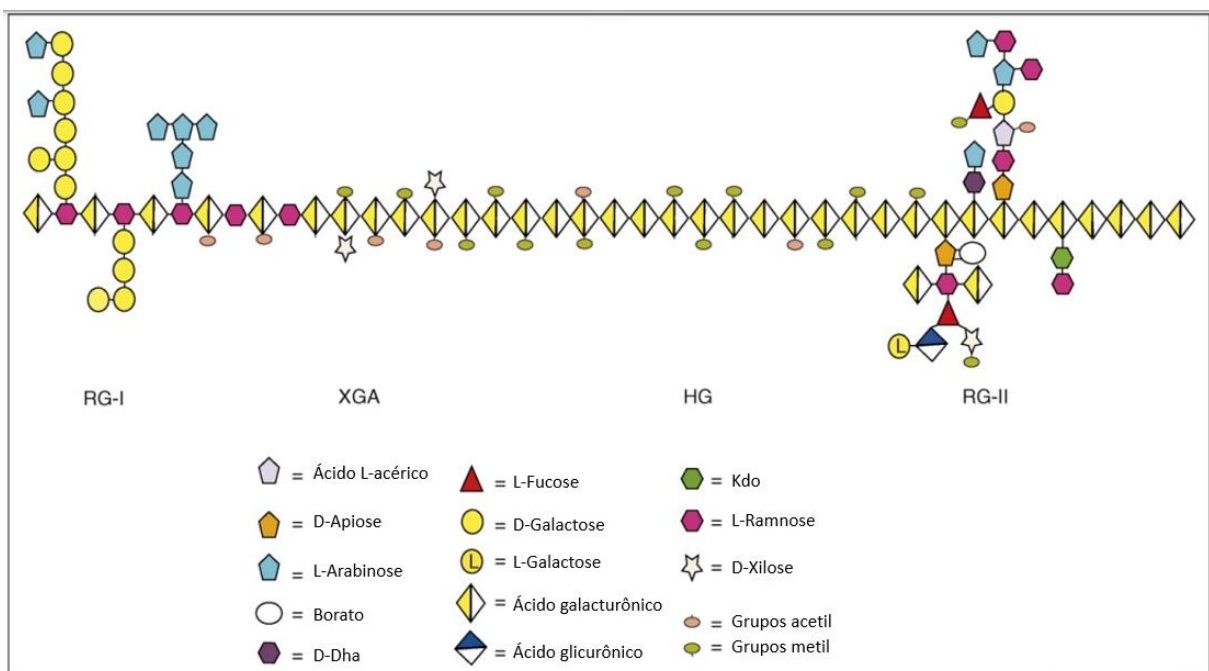


Figura 5: estrutura simplificada da pectina (adaptado de MOHNEN *et al.*, 2008).

2.2 Estudo do exoproteoma de fungos filamentosos

Fungos filamentosos desempenham um papel fundamental na natureza por serem heterótrofos e decompositores da matéria orgânica. As principais estratégias adotadas para o estabelecimento e crescimento desses organismos envolvem a secreção de um grupo de proteínas que atuam na captação de macronutrientes, sinalização, remodelamento de parede celular e competição com outros organismos (FILIATRAULT-CHASTEL et al., 2021). Por serem extremamente adaptativos, fungos filamentosos podem utilizar diversas fontes de carbono e nitrogênio para seu crescimento e, de acordo com cada uma delas, modular seu metabolismo e a biossíntese de proteínas contexto-específicas. O arsenal enzimático produzido será ajustado para a desconstrução das biomoléculas poliméricas de cada hospedeiro ao qual o fungo infecta (GIRARD et al., 2013).

A definição mais atual para o termo “secretoma”, sugerida por Agrawal et al. (2010), consiste no conjunto global de proteínas produzidas e exportadas para o meio extracelular de uma célula, tecido, órgão ou organismo, em uma condição específica, por meio de mecanismos de secreção clássicos e por vias não clássicas, envolvendo organelas secretoras constitutivas e reguladas. Apesar de o secretoma ser dinâmico e modulado pelas condições do meio, as estratégias de degradação e obtenção de nutrientes por fungos decompositores de madeira são semelhantes e comumente enquadradas em três categorias: os basidiomicetos da podridão branca degradam a lignina pela ação catalítica de lacases e peroxidases antes de degradarem a celulose; basidiomicetos da podridão marrom promovem pequenas modificações na lignina por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para obterem acesso à celulose e hemicelulose; e os ascomicetos de podridão leve atacam primeiramente as fibras de celulose e hemicelulose sem atacar a lignina, que permanece em altos teores (CRAGG et al., 2015; SPATAFORA et al., 2017).

Existem uma série de estudos publicados na literatura contendo *pipelines* definidos para predição *in silico* de secretomas, bem como abordagens para estudo de secretomas experimentais (FILIATRAULT-CHASTEL et al., 2021; GOGLEVA; DROST; SCHORNACK, 2018; VIVEK-ANANTH et al., 2018). De modo geral, a identificação de proteínas fúngicas secretadas se baseia na comparação de sequências proteicas do organismo estudado com outros organismos relacionados. A comparação normalmente é feita por algoritmos que utilizam alinhamento de sequência, como o BLAST, sendo possível associar

uma anotação funcional a uma determinada proteína com base na similaridade que ela possui com outra proteína – caracterizada experimentalmente ou com sua função predita – depositada em algum banco de dados. Uma das ferramentas mais utilizadas para esse propósito é o BLAST (DAS; ORENGO, 2016). A escolha dos bancos de dados utilizados é essencial para esse processo. O Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>) contém apenas proteínas caracterizadas experimentalmente, sendo esse um dos principais bancos de dados utilizados para a predição de funções, entretanto, devido ao número limitado de sequências depositadas, utiliza-se outros bancos de dados complementares. O MycoCosm (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/>) é um banco de dados que contém apenas genomas fúngicos caracterizados e conta com mais de 2000 genomas depositados. Outros bancos de dados como o Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), CAZy (<http://www.cazy.org/>) e KO (*Kyoto orthology*) (<https://www.genome.jp/kegg/ko.html>) fornecem informações sobre domínios catalíticos conservados e homologia (WATSON; LASKOWSKI; THORNTON, 2005). Além disso, o projeto ontologia gênica (*Gene Ontology* – GO) unifica termos utilizados para definir função molecular, processo biológico e localização de produtos gênicos e se apresenta como uma ferramenta essencial para padronizar informações e facilitar o trabalho de geração e interpretação dos dados de anotação de proteínas. É comum ter anotações funcionais escritas de forma diferentes, mas que se referem a um mesmo conceito (ASHBURNER et al., 2000).

A anotação de enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes) pode ser feita pelo programa dbCAN2. O dbCAN2 é um servidor que integra três bancos de dados internos (HMMER, DIAMOND e eCAMI) para automatizar a anotação das CAZymes, com predição da família CAZy, isto é, identificando se pertence à família das glicosil hidrolases (GH), glicosil transferases (GT), polissacarídeo liases (PL), carboitrado esterases (CE), enzimas de atividade auxiliares (AA) ou se é um módulo de ligação a carboidratos (CBM). A ferramenta Hotpep (*Homology to Peptide Pattern*) complementa essa análise ao realizar a predição de atividade enzimática de CAZymes (E.C.). Baseado na identificação de pequenos peptídeos conservados nas sequências, o Hotpep permite uma predição mais acurada da função proteica, visto que enzimas de uma mesma família podem apresentar funções distintas (BUSK et al., 2017; DRULA et al., 2022).

Nos últimos anos, surgiram diversos estudos acerca dos secretomas de fungos filamentosos. Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são comumente reportados como bons produtores de enzimas de degradação de biomassas (FLORENCIO et al., 2016; KUBICEK, 2012). Um estudo comparativo dos secretomas de *A. niger* e *T. reesei* revelou

que ambas as espécies produzem um repertório enzimático capaz de hidrolisar eficientemente o complexo lignocelulósico e que o mecanismo de desconstrução parece favorecer primeiro a hidrólise de polissacarídeos como arabinoxilana e β -glicana, presentes na hemicelulose. Em números gerais, *A. niger* produziu um número maior de enzimas que *T. reesei* quando cultivados em bagaço de cana-de-açúcar e colmo de acordo com a análise feita por LC-MS/MS LTQ Velos Orbitrap (BORIN et al., 2015).

O extrato bruto de *P. echinulatum* cultivado em quatro fontes de carbono diferentes por 96h foi analisado por 1D-LC-MS/MS em estudo que revelou o potencial do fungo de secretar 165 proteínas diferentes, sendo quase um terço delas identificadas como CAZymes. A maior parte das enzimas secretadas foram preditas como pertencentes à família das glicosil hidrolases, enquanto enzimas como pectinases, ligninases e amilases foram pouco expressas (SCHNEIDER et al., 2016). Em estudo feito por Sun, Lu & Xie (2018), em que o secretoma de *T. reesei* CICC 41495 cultivado em farelo de trigo por SmF foi analisado, foram identificadas 23 proteínas envolvidas na degradação de polissacarídeos lignocelulósicos, incluindo enzimas como xiloglucanases, cellobiohidrolases e α -arabinofuranosidases. No entanto, o baixo número de proteínas identificadas pode estar relacionado ao método de detecção por MALDI-TOF/TOF.

Um estudo realizado para comparar o secretoma predito de duas cepas diferentes de *A. niger* demonstrou que a cepa industrial *A. niger* CBS 513.88 secreta, por vias clássicas, 1831 proteínas das 14.086 codificadas em seu genoma, enquanto a cepa *A. niger* ATCC 1015 foi predita para secretar 1015 proteínas das 11.200 codificadas em seu genoma (BRAAKSMA et al., 2010).

Tavares et al. (2021) reportaram pela primeira vez o secretoma experimental do fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis*, em análise feita por 1D-LC-MS/MS do extrato bruto deste organismo cultivado em farelo de trigo por SSF, revelando a presença de 313 proteínas secretadas, sendo 137 delas preditas como CAZymes. O estudo do bioinfosecretoma de *Penicillium ochrochloron* RSL11 demonstrou que dos seus 12015 genes codificadores de proteínas, 737 foram preditos como CAZymes, número superior ao relatado para outros fungos *Penicillium* (MORGAN, et al., 2022). Esses trabalhos demonstraram o potencial de cada espécie estudada para a produção de enzimas para a sacarificação de biomassas.

2.3 O fungo *Talaromyces pinophilus*

Talaromyces pinophilus (figura 6), anteriormente designado como *Penicillium pinophilum*, é um fungo ascomiceto endofítico da família *Trichocomaceae* (SAMSON et al., 2011). Sendo isolado em espécies vegetais e no solo de regiões semiáridas, o fungo *T. pinophilus* é relatado como agente promotor do crescimento de plantas por atuar na captação de nutrientes essenciais, como potássio (MAITY et al., 2014) e por inibir o crescimento de *Botrytis cinérea*, fungo causador da podridão cinzenta em vegetais como cebola e morango (ABDEL-RAHIM; ABO-ELYOUSR, 2018).



Figura 6: podridão marrom-azulada em raízes de beterraba causadas por *T. pinophilus* após uma semana (à esquerda) e três semanas (à direita) de infecção (HAQUE; PARVIN, 2020).

O genoma e o secretoma predito de *T. pinophilus* foram elucidados e foi observado a presença de 803 genes codificados como enzimas ativas em carboidratos (CAZymes), sendo 156 delas preditas como enzimas de degradação de parede celular, que incluem celulases, xilanases, arabinofuranosidases e pectinases (LI et al., 2017).

Embora o genoma de *T. pinophilus* já tenha sido elucidado, nenhum estudo envolvendo a comparação do secretoma experimental com o secretoma predito deste mesmo fungo foi relatado. A utilização de uma fonte de carbono específica, bem como a metodologia de cultivo do organismo afetam diretamente no perfil de enzimas produzidas. Estudos anteriores já revelaram a capacidade de *T. pinophilus* de secretar enzimas de degradação de parede celular. Já foi demonstrado que o fungo *T. pinophilus*, quando cultivado em capim elefante sob fermentação submersa, produziu um extrato enzimático com alta atividade hemicelulolítica aplicável na sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar (VISSER et al., 2013). Por outro lado, a utilização de um meio suplementado com micronutrientes e o cultivo em pH 7.5 durante 28 dias favorece a produção de altos níveis de lacases por *T. pinophilus* (DHAKAR et al., 2014).

2.4 Arabinofuranosidases

Arabinofuranosidases (ABFs) são enzimas que atuam na clivagem de resíduos de L-arabinofuranosídeo ligados a oligossacarídeos, polissacarídeos ou a substratos sintéticos, podendo atuar em mecanismos endo ou exo. A hemicelulose, segundo biopolímero mais abundante do planeta, e a pectina, que também compõe a parede celular, são exemplos de polímeros de ocorrência natural constituídos por polissacarídeos que contêm L-arabinose, tais como arabinana, arabinoxilana e arabinogalactana (TSUJIBO et al., 2002). Atualmente, muitos setores industriais incluem etapas de degradação de biomassas vegetais para a obtenção de produtos biotecnológicos; nesse sentido, as ABFs vêm recebendo destaque por sua relevância biotecnológica, uma vez que são relatadas como enzimas limitantes para a degradação total de alguns resíduos vegetais (ALVIRA; NEGRO & BALLESTEROS, 2011). Arabinofuranosidases vêm sendo aplicadas em processos diversos que demandam a degradação de biomassas lignocelulósicas, desempenhando papéis fundamentais na indústria de papel e celulose, no tratamento de resíduos e produção de bioetanol (PORIA et al., 2020b).

As ABFs são divididas em grupos que se diferem de acordo com seu substrato específico e modo de ação; cada um desses tipos é designado por um número EC (*Enzyme Commission*) como definido pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), sendo todas as ABFs pertencentes à família das glicosil hidrolases (E.C. 3.2.1). Pelo menos três grupos diferentes de ABFs já foram caracterizados: α -L-arabinofuranosídeo hidrolases (E.C. 3.2.1.55), β -L-arabinosidases (E.C. 3.2.1.88) e *endo*-1,5- α -arabinanases (E.C. 3.2.1.99).

Existe também uma classificação em que as ABFs são divididas em três tipos: o tipo A hidrolisa α -1,5-L-arabinofuranosídeo, arabino-oligômeros e o substrato sintético p -nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (p NP α Ara), mas não atua em polímeros. O tipo B atua na hidrólise de ligações glicosídicas de α -L-arabinofuranosil com polímeros lineares (como arabinana) ou ramificados (como arabino-oligossacarídeos), bem como o p NP α Ara, liberando xilose e L-arabinose. Por fim, o tipo C inclui ABFs específicas para substratos naturais, sendo conhecidas como β -D-arabinoxilana arabinofuranohidrolases (AXH), sendo essas incapazes de atuarem sob o substrato sintético p NP α Ara (CONTESINI et al., 2017).

As α -L-arabinofuranosidases representam um grupo importante das ABFs. Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,5 entre resíduos de L-arabinofuranosil de oligossacarídeos, polissacarídeos e substratos sintéticos (figura 7)

(NUMAN; BHOSLE, 2006). As α -ABFs estão distribuídas nas famílias GH3, GH43, GH51, GH54, GH62 e GH93, sendo a família GH62 a única constituída apenas por α -ABFs. A família GH54 inclui algumas α -ABFs descritas como bifuncionais, embora existam poucos estudos com foco na especificidade funcional dessa família (MOTTA et al., 2021).

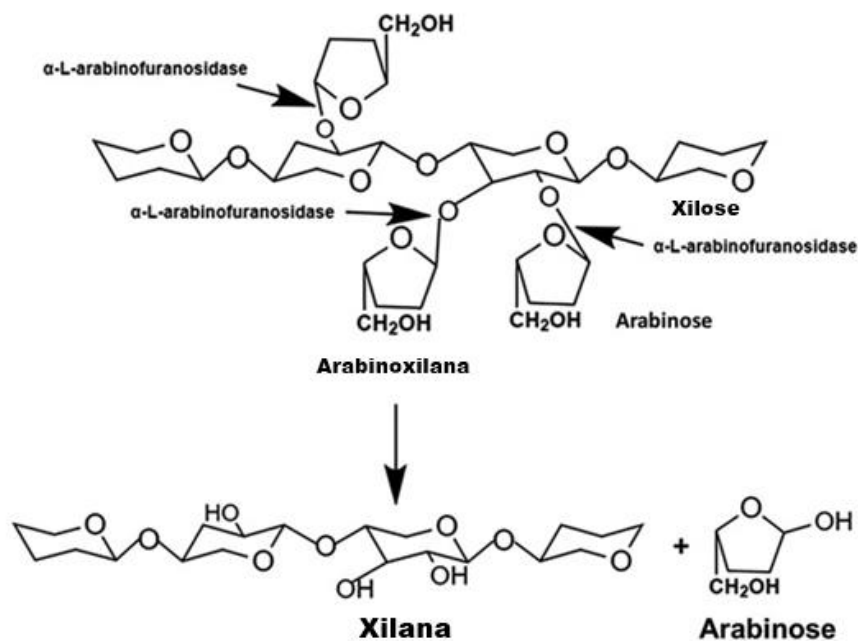


Figura 7: α -L-arabinofuranosidase atuando na hidrólise de ligações entre L-arabinose e xilana em diferentes posições (adaptado de PARAMESWARAN; VARJANI; RAVEENDRAN, 2019).

α -L-Arabinofuranosidases da família GH54 já foram relatadas e caracterizadas em fungos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*. Em estudo publicado por Guais et al. (2010) foram identificados quatro genes codificantes de α ABFs da família GH54 pelo fungo *Talaromyces funiculosus*, sendo esses produtos gênicos enzimas que compartilham características específicas como um domínio catalítico no N-terminal e um domínio de ligação a arabinose (ABD) conectado ao C-terminal. O fungo *Penicillium sp.* LYG 0704 foi reportado como produtor de uma α -L-arabinofuranosidase da família GH54 que apresentou efeito sinérgico com coquetéis comerciais contendo xilanase e celulase, sendo observado um aumento de 2,9 vezes na liberação de arabinose quando comparado com a ação individual do extrato comercial (LEE et al., 2011). Em outro estudo publicado por Sakamoto et al. (2013), duas α ABFs das famílias GH51 e GH54 do fungo *Penicillium chrysogenum* foram expressas em *E. coli* e as enzimas recombinantes mantiveram características bioquímicas iguais às suas equivalentes nativas, tendo atividade ótima a 50 °C e pH 5.0. Ravanal & Eyzaguirre (2015)

caracterizaram uma das quatro α -L-arabinofuranosidases secretadas por *Talaromyces purpurogenum* e purificaram a enzima com massa molecular de 68 kDa, relativamente maior que a massa predita de 52 kDa, indicando alguma modificação pós-traducional.

A indústria de alimentos abrange uma série de possíveis aplicações para as α -L-arabinofuranosidases, como na liberação de ácido acético para a produção de pães, clarificação de sucos de frutas, na produção de bebidas fermentadas como o vinho e na extração de componentes como café, amido e óleos vegetais (PARAMESWARAN; VARJANI; RAVEENDRAN, 2019). Na indústria de bioetanol, α ABFs são utilizadas na sacarificação de biomassas pré-tratadas para aumentar o rendimento de hidrólise da celulose e hemicelulose (PATEL et al., 2015). Alguns estudos mostram também que arabinofuranosidases podem ter aplicações benéficas na saúde animal, pois liberam oligossacarídeos de arabinoxilana com potencial de atuarem como prebióticos (SERI et al., 1996) e liberam também arabinose, que inibe a sacarase e atua como agente antiglicêmico (NUMAN; BHOSLE, 2006).

Na indústria da produção de frangos de corte, o uso de dietas baseadas em cereais suplementadas com enzimas ativas em polissacarídeos não amiláceos, como xilanases e arabinofuranosidases, levam ao aumento da digestibilidade desses alimentos, resultando em maior performance no crescimento dos frangos e reduzindo os custos da alimentação (SALEH et al., 2019). α -Arabinofuranosidases constituem algumas das enzimas usadas na indústria do papel que beneficiam o processo de delignificação, pois atuam na remoção de grupos laterais presentes na hemicelulose, como arabinofuranosídeos, que restringem a ação de enzimas usadas no processo de branqueamento da polpa (SPRINGER-VERLAG et al., 1993). Estudos voltados para o tratamento de doenças causadas por *mycobacterium*, como *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose, vêm desenvolvendo drogas anti-*mycobacterium* com alvo na destruição do envelope celular desses organismos. A parede celular de *mycobacterium* é constituída por macromoléculas como lipoarabinomanana e arabinogalactanana, portanto o uso de arabinofuranosidases na composição dessas drogas mostra-se essencial para destruir o envoltório celular desses patógenos (ASMARANI; FANANI; PUSPANINGSIH, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o secretoma experimental de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja e compará-lo ao secretoma predito *in silico*, identificando as proteínas secretadas nessa condição e suas porcentagens de sinal de íon acumulado. Purificar a enzima secretada em maior abundância nesta condição, a α -ABF da família GH54, caracterizá-la bioquimicamente e avaliar sua eficiência na sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar as proteínas presentes no extrato enzimático de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja e suas intensidades de sinal;
- Identificar as funções preditas de cada proteína presente no secretoma de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja e suas classes de família CAZy;
- Realizar a predição das CAZymes extracelulares de *T. pinophilus* com base em seu genoma;
- Avaliar experimentalmente as atividades enzimáticas do extrato bruto de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja, com ênfase na atividade de α -L-arabinofuranosidase;
- Caracterizar a α -L-arabinofuranosidase da família GH54 no extrato de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja;
- Avaliar o efeito da suplementação de α -L-arabinofuranosidase em coquetel enzimático comercial utilizado na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo e materiais

O fungo *Talaromyces pinophilus* foi anteriormente isolado de resíduos agroindustriais de uma instalação pecuária em Minas Gerais e rotineiramente propagado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) a 28 °C por 2-10 dias. Cortes do meio BDA contendo o micélio do fungo foram utilizados para a manutenção do microrganismo no estoque micológico do Laboratório de Análises Bioquímicas em glicerol 30% (v/v) a -80 °C.

A casca de soja foi obtida da Caramuru Alimentos[®]. A coluna DEAE-Sepharose foi obtida da GE Healthcare (Uppsala, Swedwn) e a coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) foi

obtida da Shimatzu. Todos os produtos químicos foram produzidos pela Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA), Himedia Laboratories Co. (Mumbai, Maharashtra, Índia), Merck (Darmstadt, Alemanha), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e Vetec Química Fina (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Todos os solventes orgânicos e produtos químicos sólidos utilizados apresentavam procedência e grau de pureza analítica.

4.2 Caracterização centesimal da casca de soja

Os métodos para determinar a composição da casca de soja foram baseados na metodologia descrita por NREL (National Renewable Energy Laboratory, 2013) com algumas adaptações. Para a determinação dos extrativos etéreos, a casca de soja *in natura* foi submetida à extração contínua em refluxo no aparelho de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente durante 16 horas; em seguida, para a determinação dos extrativos hidroalcoólicos, a biomassa foi submetida à extração contínua em refluxo utilizando inicialmente água destilada como solvente durante 16 horas e posteriormente álcool etílico absoluto como solvente por mais 16 horas. O teor de extrativos totais (soma dos extrativos etéreos e hidroalcoólicos) foi estimado por gravimetria.

Para a determinação dos carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) e lignina, foi utilizada a biomassa livre de extrativos. Isso foi feito por hidrólise ácida em duas etapas: a primeira etapa a 30 °C em solução de H₂SO₄ a 72% (p/v) durante 60 minutos; a segunda etapa a 120 °C em solução de H₂SO₄ a 4% (p/v) durante 60 minutos. Após as duas etapas, o meio de hidrólise foi filtrado em cadinho de placas sinterizadas, previamente calcinado em mufla, conectado a uma bomba de vácuo. A fração sólida foi incubada em estufa a 105 °C até atingir peso constante para a determinação da lignina insolúvel. A fração líquida foi submetida a duas análises: alíquotas do filtrado diluídas com água deionizada foram analisadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm para a quantificação da lignina solúvel; para a análise dos carboidratos estruturais, alíquotas do filtrado diluídas com água deionizada foram aplicadas em HPLC Shimadzu da série 10A equipado com coluna Aminex HPX-87H para a quantificação de glicose, celobiose, xilose, arabinose e ácido acético. Após a quantificação desses compostos, o teor de celulose foi estimado pela soma dos teores de celobiose e glicose corrigidos pela perda da massa de uma molécula de água, decorrente da reação de condensação da ligação glicosídica; o teor de hemicelulose foi estimado pela soma dos teores de xilose, arabinose e ácido acético, com o mesmo fator de correção.

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de digestão de Kjeldahl descrito pela *Association of Official Analytical Chemists – AOAC* (1997), usando o fator de correção de 5,75, como recomendado pela Anvisa para proteínas de origem vegetal. O teor de cinzas foi determinado pela carbonização total de amostras da casca de soja em cadinho de vidro, utilizando mufla a 575 ± 25 °C, também de acordo com a metodologia descrita pelo NREL (National Renewable Energy Laboratory, 2013).

4.3 Obtenção e análise do secretoma experimental

4.3.1 Preparação da amostra e digestão triptica em gel

O extrato bruto produzido por *T. pinophilus* cultivado em casca de soja foi filtrado em filtro de seringa contendo membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm (Millipore, Alemanha). Ao extrato bruto filtrado, foi adicionado etanol absoluto pré-resfriado na proporção de 10:1, e a mistura foi mantida a -20 °C durante a noite. As amostras foram então centrifugadas a 8000 x g por 20 min a 4 °C. Os pellets secos à temperatura ambiente foram reconstituídos em um volume apropriado de solução de lise (ureia 8 M; tioureia 2 M; 4% CHAPS).

A amostra proteica (30 µg) foi ressuspensa na concentração final de 0,0625 M de Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% e mercaptoetanol 5%. Essa mistura foi fervida por 5 min, antes de ser submetida à eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Os géis de empilhamento e separação continham 4% e 10% de poliácridamida, respectivamente. As amostras foram processadas por aproximadamente 20 min em um sistema eletroforético Mini-Protean II (Bio-Rad) usando uma corrente constante de 20 mA. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 e a banda de proteína (aproximadamente 0,5 cm × 1 cm) foi excisada. A fatia de gel foi fragmentada em pedaços menores (aproximadamente 1 mm²) e então lavada com solução de descoloração contendo 50% de acetonitrila (ACN) e 20 mM de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃). As amostras proteicas foram reduzidas e alquiladas com 50 mM de ditioneitol (DTT) e 100 mM de iodoacetamida, respectivamente. Após 3 lavagens com uma solução de 50% ACN e 20 mM NH₄HCO₃, as amostras foram secas e digeridas usando a solução de tripsina modificada de grau de sequenciamento (20 ng/µL Trypsin Gold da Promega em 20 mM NH₄HCO₃) por 18 h a 37 °C. A extração dos peptídeos tripticos foi realizada duas vezes utilizando a solução contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) em 50% (v/v) de ACN. A amostra foi seca em sistema Speed Vacuum e

os peptídeos foram reconstituídos na solução contendo 20 µL de ACN 2% (v/v) e TFA 0,1% (v/v).

4.3.2 Identificação dos peptídeos tripticos

A análise dos peptídeos foi realizada em espectrômetro de massas Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) conectado ao sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem, West Palm Beach, FL, EUA) e a identificação dos peptídeos foi realizada com o software MaxQuant v.1.6.3.3 (COX; MANN, 2008) como descrito por Morgan et al. (2022), com a diferença que o fungo utilizado foi *T. pinophilus*. A quantificação foi feita utilizando o método de quantificação livre de marcação (*label-free quantification*, LQF). Os parâmetros de confiabilidade de identificação foram estabelecidos como 1% para o nível de falsas descobertas (*false discovery rate*, FDR) e um mínimo de 2 peptídeos únicos. O experimento foi realizado em triplicata e a análise estatística dos dados foi conduzida no ambiente R (versão 3.5.3) (R DEVELOPMENT CORE TEAM., 2010). O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a média das porcentagens de sinal de íon acumulado entre os tratamentos. A hipótese nula foi definida como médias iguais e a hipótese alternativa foi definida como médias diferentes. O nível de significância foi 5% para todas as conclusões.

O arquivo de saída gerado pelo software MaxQuant foi analisado para manter apenas as proteínas identificadas com alta confiabilidade. Para isso, foram removidos os sinais relativos aos contaminantes, interferentes e picos de baixa qualidade, além dos recursos identificados com *missing values*, isto é, valores de intensidade de sinal identificados em apenas uma ou duas das três replicatas experimentais. Após o tratamento desses resultados, manteve-se uma lista contendo apenas as proteínas identificadas com alta qualidade.

Como estratégia de anotação, as sequências das proteínas identificadas no secretoma foram submetidas ao meta-servidor dbCAN2 (<http://cys.bios.niu.edu/dbCAN2/index.php>), que integra três bancos de dados para anotação automatizada de CAZymes: HMMER; DIAMOND e Hotpep. Os *hits* foram considerados positivos quando identificados por pelo menos dois bancos de dados. O dbCAN2 foi usado para gerar uma lista de todas as CAZymes presentes no proteoma predito e forneceu a anotação em termos de família CAZy de acordo com o grupo catalítico de cada proteína, sendo elas: enzimas de Atividades Auxiliares (AA); Glicosil Hidrolases (GH); Polissacarídeos Liases (PL); Carboidratos Esterases (CE) e; Módulo de Ligação de Carboidratos (CBM). Proteínas classificadas como módulos de ligação de

carboidratos (CBM) e glicosiltransferase (GT) foram identificadas, mas não incluídas em análises posteriores. A atribuição de função foi determinada usando o pacote de software Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>). As sequências de proteínas tiveram suas funções anotadas com base em pesquisas usando BLASTp versão 2.2.21, restrito ao filtro de taxonomia de fungos. Para cada proteína predita, o peso molecular teórico (Mw) e o ponto isoelétrico (pI) foram calculados usando a ferramenta “Compute pI/Mw” (https://web.expasy.org/compute_pi/). A predição de sítios de *O*-glicosilação na sequência da α -ABF da família GH54 de *T. pinophilus* foi feita usando o software NetOGlyc 4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetOGlyc-4.0>) (STEENTOFTE et al., 2013) e a predição de sítios de *N*-glicosilação foi feita usando o software NetNGlyc 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>).

4.4 Predição de CAZymes extracelulares baseada no genoma de *T. pinophilus*

O genoma do isolado 1-95 de *Talaromyces pinophilus* (LI et al., 2017) foi recuperado do banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com número de acesso GCA_001571465.2. A sequência completa do genoma foi submetida ao programa AUGUSTUS para a predição dos genes (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) (STANKE; MORGENSTERN, 2005) usando os parâmetros padrões e treinados em modelos de genes para *Aspergillus niduans*. A anotação em termos de função e famílias CAZy do proteoma predito foi realizada utilizando o pacote BLASTp versão 2.2.21 e o servidor dbCAN2, assim como no pipeline utilizado para a anotação funcional do secretoma experimental. A predição de localização subcelular e das proteínas potencialmente secretadas de *T. pinophilus* foi realizada submetendo a lista das CAZymes preditas deste microrganismo para análise utilizando o software DeepLoc-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-2.0>) de acordo com as ferramentas de pipeline para secreção clássica, usando o método rápido de análise. Proteínas direcionadas às vias de secreção não clássicas foram identificadas usando o servidor SecretomeP 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SecretomeP-2.0>).

4.5 Identificação molecular do microrganismo

4.5.1 Extração do DNA

A identificação molecular foi realizada comparando a região ITS1–ITS4 do fungo *Talaromyces pinophilus* com outras sequências disponíveis em bancos de dados públicos. Após 7 dias de cultivo do fungo em meio BDA, o micélio obtido foi cuidadosamente removido com uma espátula estéril e transferido para microtubos para serem triturados em sistema TissueLyser por 90 segundos a 22 Hz.

O DNA total foi extraído usando 0,4 mL de tampão de extração (50 mM TrisHCl pH 8,8, 20 mM EDTA pH 7,5, SDS 2,0% (p/v) e 150 mM NaCl) e incubado em banho-maria a 70 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,35 mL de acetato de potássio 5M e a solução foi colocada em banho de gelo por 30 minutos. A solução foi centrifugada a 16000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um microtubo contendo 0,5 mL da mistura fenol-clorofórmio (1:1) e homogeneizado por 5 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 16000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Essas etapas de lavagem foram repetidas, usando apenas clorofórmio, para desproteinização do precipitado. O precipitado foi ressuspenso em isopropanol frio, armazenado a -20 °C por 30 minutos e em seguida foi centrifugado a 16000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet restante foi lavado com etanol 70% e seco a temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 30 µL tampão de extração (10 mM Tris-HCl, 1M EDTA, pH 8) e 1,0 µL de RNase e por fim incubado a 37 °C por 30 minutos. Após esse tempo, o DNA genômico estava pronto para análise por PCR e sequenciamento.

4.5.2 Amplificação do gene e sequenciamento

Para confirmar a identidade dos isolados, as sequências parciais do gene ITS/rRNA foram amplificadas e sequenciadas usando os primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). Cada reação de PCR foi preparada em um volume total de 15 µL contendo 7,5 µL GoTaq Colorless Master Mix (Promega), 1,5 µL de cada primer (10 µM; Sigma Aldrich), 2,0 µL do DNA genômico (15 ng/µL) e 2,5 µL de água livre de nuclease. A PCR foi realizada em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems) com um programa que consistia em desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 32 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 5 minutos, com extensão final a 72 °C por 5 min.

Os produtos de PCR foram separados em géis de agarose 0,8% (w/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-base, 20 mM ácido acético, 1,0 mM EDTA, pH 8,0), corados com brometo de etídio (1,0 µg/mL) e visualizado em um sistema fotodocumentador de gel L-PIX (Loccus Biotechnology). O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com o kit 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, CA, EUA).

Os produtos de PCR foram purificados usando Illustra™ GFX™ PCR DNA e sequenciados em um sequenciador ABI PRISM 3100. Os reagentes e equipamentos utilizados para o sequenciamento do DNA foram da Applied Biosystems. As sequências consenso foram montadas usando SeqAssem (Hepperle, 2004). Todas as sequências foram verificadas e ajustadas manualmente, e as posições ambíguas dos nucleotídeos foram esclarecidas. Para uma identificação inicial, as sequências de consenso foram comparadas e analisadas usando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e a porcentagem de identidade foi verificada.

4.6 Cultivo do fungo e produção de enzimas

A produção enzimática foi induzida por fermentação submersa. Para isso, o fungo *T. pinophilus* foi propagado em placas contendo meio BDA durante 5 dias a 28 °C em incubadora BOD. Após esse tempo, 9 discos de ágar (Ø = 5,0 mm) contendo o micélio do microrganismo foram inoculados ao meio mineral, previamente autoclavado por 20 minutos, com a seguinte composição: 1,5 g/L de KH₂PO₄, 1,0 g/L de NH₄NO₃, 0,5 g/L de MgSO₄, 1,5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de peptona, 0,2 g/L CaCl₂, 0,03 g/L de MnCl₂, 0,025 g/L de FeSO₄ e 0,004 g/L de ZnSO₄ e 3% (p/v) de casca de soja moída (30 mesh). A fermentação foi feita em erlenmeyers de 250 mL contendo 125 mL do meio mineral. Os frascos foram incubados em shaker rotatório por 7 dias a 28 °C e 150 rpm. Após esse tempo, o extrato bruto foi obtido por filtração simples utilizando filtro de nylon. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 10000 x g por 20 minutos a -4 °C e o sobrenadante clarificado foi armazenado para as análises subsequentes.

4.7 Dosagem de proteínas e ensaios enzimáticos

Para determinar a quantidade de proteínas totais presente no extrato bruto e nas frações obtidas nas etapas de purificação, foi utilizado um método adaptado de Bradford (BRADFORD, 1976). O ensaio foi realizado em triplicata e a leitura feita em espectrofotômetro no

comprimento de onda de 595 nm. A reação foi feita em tubos ensaios contendo 800 μL da amostra proteica devidamente diluída e 200 μL do reagente de Bradford 5X. As leituras foram realizadas após 15 minutos de repouso e na ausência de luz e os valores de absorvância foram utilizados para calcular a concentração de proteínas a partir de uma curva padrão feita utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão de proteínas. Uma amostra controle foi feita utilizando água destilada em vez do extrato enzimático.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5, a 50 °C. Cada ensaio foi realizado em triplicada e foram consideradas apenas as médias das atividades enzimáticas com valor desvio-padrão inferior a 10%. Uma amostra controle foi realizada para cada ensaio com a adição do extrato enzimático apenas após a paralisação da reação.

Para o ensaio de FPAse, realizado como descrito por Ghose (1987), o substrato utilizado foi papel filtro Whatman No. 1 (1 x 6 cm, 50 mg). O ensaio foi feito em 1,4 mL de tampão e 100 μL do extrato enzimático previamente diluído e incubado em banho-maria durante 60 minutos. Após esse tempo, a reação foi paralisada com a adição de 500 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS) e levada a banho fervente por 5 minutos para a desnaturação das enzimas. O total de açúcares redutores liberados após a reação foi quantificado pelo método descrito por Miller (1959), utilizando glicose como padrão, e a absorvância foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm, assim como todos os outros ensaios baseados no método de DNS.

Para os ensaios de α -amilase, endoglicanase, mananase e poligalacturonase foram utilizados amido (1% p/v), carboximetilcelulose (1,25% p/v), *locust gun bean* (0,625% p/v) e ácido poligalacturônico (0,25% p/v) como substratos, respectivamente. As reações foram feitas utilizando 200 μL do substrato preparado em tampão e 50 μL do extrato enzimático devidamente diluído durante 30 minutos. A atividade de xilanase foi determinada utilizando 200 μL xilana de beechwood (1,25% p/v) como substrato e 50 μL do extrato enzimático diluído durante 15 minutos. Para todos esses ensaios, a reação foi paralisada pela adição de 250 μL de DNS e a absorvância foi mensurada a 540 nm para quantificar os açúcares redutores liberados ao longo da reação.

As atividades de α -arabinofuranosidase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -glicosidase, β -glicosidase, β -xilosidase e β -manosidase e foram mensuradas utilizando 50 μL de $\rho\text{NP-}\alpha$ -arabinofuranosídeo ($\rho\text{NP}\alpha\text{Ara}$), ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo ($\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$), ρ -nitrofenil-

β -D-galactopiranosídeo (ρ NP β Gal), ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ NP α Glc), ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NP β Glc), ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NP β Xil), ρ -nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (ρ NP β Man) 2 mM como substratos (1 mM na concentração final), 30 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5 e 20 μ L do extrato enzimático diluído. Os meios de reação foram incubados por 15 minutos e a reação foi paralisada pela adição de 100 μ L de carbonato de cálcio 0,5 M. A absorbância foi mensurada a 410 nm e o total de ρ -nitrofenol foi estimado por meio de uma curva de calibração construída utilizando uma solução de pNP como padrão.

A atividade de lacase foi determinada monitorando a oxidação do substrato ácido azino-bis(3-etilbenzothiazoline-6-sulfônico) (ABTS). O meio reacional continha 100 μ L do extrato enzimático, 350 μ L de tampão e 50 μ L de ABTS 10 mM. A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos e a absorbância foi mensurada a 420 nm. A atividade de lacase foi calculada pela lei de Lambert-Beer usando o coeficiente de extinção molar de $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Visser, et al., 2015)

Para todos os ensaios descritos, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μ mol do produto correspondente (açúcar redutor ou ρ -nitrofenol) por minuto, nas condições utilizadas do ensaio.

4.8 Purificação

O extrato enzimático de *T. pinophilus* foi inicialmente concentrado 3,5 vezes em sistema de ultrafiltração Amicon® Ultra 15 Centrifugal Filter Unit - Millipore equipado com membranas de celulose que retêm de moléculas com massa molecular superior a 3 kDa, centrifugado a uma velocidade de 4000 x g a 4 °C.

A amostra concentrada foi então filtrada e submetida a uma cromatografia de troca iônica, em sistema de *Fast Protein Liquid Chromatography* - FPLC, ÄKTA system (GE Healthcare). A coluna de troca aniônica utilizada, DEAE-Sepharose, foi previamente equilibrada com 40 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 (tampão A). Foram então injetados 5 mL da amostra no sistema de FPLC e as proteínas foram eluídas em 40 mL do tampão A seguidos por um gradiente salino linear (0 a 1,0 M) de NaCl em tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,5 (tampão B). A cromatografia foi realizada a um fluxo de 4 mL/min, pressão de 0,3 MPa e frações de 2,5 mL foram coletadas em cada tubo. Os tubos contendo

maior atividade de arabinofuranosidase foram reunidos e utilizados para os ensaios de caracterização e análise por SDS-PAGE.

4.9 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes foi realizada seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970) com o propósito de observar o padrão de bandas existentes no extrato bruto e em cada uma das etapas de purificação.

O gel de separação foi preparado a partir da mistura de 5,03 mL de água destilada, 3,75 mL do tampão de Tris/HCl pH 8,8, 6 mL de solução acrilamida/*N,N*-metileno bisacrilamida 30% (p/v), 0,15 mL de SDS 10% (p/v), 0,075 mL de persulfato de amônio (PSA) 10% (p/v) e 7,5 μ L de *N,N,N,N*-tetrametil-etilenodiamino (TEMED). O gel de empilhamento foi preparado a partir da mistura de 4,1 mL de água destilada, 0,76 mL de tampão Tris/HCl pH 6,8, 1 mL da solução acrilamida/*N,N*-metileno bisacrilamida 30% (p/v), 0,06 mL de SDS 10% (p/v), 0,06 mL de PSA 10% (p/v) e 6 μ L de TEMED.

Para serem aplicadas no gel, as amostras foram previamente diluídas e precipitadas com ácido tricloroacético para obter 30 μ g de proteínas totais. Para isso, 1 mL das amostras foram adicionados em microtubos de 1,5 mL e a cada um deles foi adicionado 0,25 mL de TCA 50% (p/v), atingindo uma concentração final de 12,5% (p/v). Os tubos foram deixados em banho de gelo durante 60 minutos, sendo homogeneizados em vórtex a cada 10 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 16000 x g e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados foram lavados com 1 mL acetona gelada para remover o excesso de TCA e centrifugados novamente por 10 minutos a 16000 x g. O processo de lavagem foi realizado três vezes. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram secos a temperatura ambiente para total evaporação da acetona. Por fim, cada uma das amostras precipitadas foram ressuspensas em 0,025 mL de tampão de extração (0,19 M Tris/HCl, pH 6,8, 2,3% (p/v) de SDS, 1% (v/v) de glicerol, 5,0% (v/v) de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol).

As amostras precipitadas e solubilizadas no tampão de extração foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética foi realizada a temperatura ambiente a 100 mV por aproximadamente 3 horas. Após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas e adicionado a uma solução fixadora contendo metanol, ácido acético e água (50:12:38 v/v) por duas horas. Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes com etanol 50% por 10 minutos a cada lavagem e, em seguida,

incubado em solução de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) por 1 minuto e imediatamente lavado com água destilada por cerca de 10 segundos. O gel foi incubado em solução de nitrato de prata 0,2% (p/v) com 0,037 mL de formaldeído 37% (v/v) e após esse tempo foi lavado novamente com água destilada para remover o excesso da solução corante. Finalmente, o gel foi transferido para 50 mL da solução reveladora (2g de carbonato de sódio, 1 mL da solução de tiosulfato de sódio 0,02% e 0,025 mL de formaldeído 37%).

Os marcadores de massa molecular utilizados, obtidos da Bio-Rad Laboratories, consistiam em uma mistura de 10 proteínas recombinantes marcadas de 10 a 250 kDa, incluindo bandas de referência de 25, 50 e 75 kDa.

4.10 Caracterização bioquímica

4.10.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

Para a definição do efeito do pH na atividade da α -arabinofuranosidase purificada, os ensaios foram realizados em diferentes tampões, cobrindo a faixa de pH de 1,5 a 8 (pH 1,5 a 3 - tampão glicina-HCl 100 mM; pH 4 a 6 - tampão acetato de sódio 100 mM; pH 7 a 8 - tampão Tris-HCl). A atividade de α -arabinofuranosidase foi mensurada seguindo as condições dos ensaios enzimáticos padronizados, variando somente o tampão utilizado. O valor de pH em que foi observada a maior atividade dentre todos os valores testados foi definido como o pH ótimo.

Para a avaliação da estabilidade, a α -arabinofuranosidase purificada foi pré-incubada durante 60 minutos em tampões com diferentes valores de pH (pH 1,5 a 3 - tampão glicina-HCl 100 mM; pH 4 a 6 - tampão acetato de sódio 100 mM; pH 7 a 8 - tampão Tris-HCl); após esse tempo, os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com as condições padronizadas no item 4.4.

4.10.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

Para a definição do efeito da temperatura na atividade da α -arabinofuranosidase purificada, os ensaios foram realizados nas temperaturas de 30 a 70 °C em intervalos de 5 °C. A atividade de α -arabinofuranosidase foi mensurada seguindo as condições dos ensaios enzimáticos padronizados no item 4.4, variando somente a temperatura de reação.

Para a avaliação da termoestabilidade, as enzimas foram pré-incubadas durante 15, 30, 60 minutos, 2, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas nas temperaturas de 50, 55 e 60 °C. A atividade

residual de α -arabinofuranosidase foi mensurada seguindo as condições dos ensaios enzimáticos padronizados no item 4.4. Os valores de meia vida ($t_{1/2}$) foram estimados por meio de modelos de correlação entre a atividade residual e o tempo de incubação, usando o programa OriginPro versão 9.

4.10.3 Atividade na presença de íons, moduladores e agentes desnaturantes

Os ensaios enzimáticos foram realizados na presença de 1 mM de ureia, EDTA, Tween 80 e os seguintes sais metálicos: CaCl_2 , KCl , NaCl , MgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , ZnSO_4 , CuCl_2 e FeSO_4 . Os ensaios foram feitos em triplicata e de acordo com as condições padronizadas.

4.10.4 Especificidade de substratos

Para avaliar a especificidade da α -arabinofuranosidase purificada, foram testados os seguintes substratos: $\rho\text{NP}\alpha\text{Glc}$, $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$, $\rho\text{NP}\beta\text{Xil}$, $\rho\text{NP}\beta\text{Man}$, $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, $\rho\text{NP}\beta\text{Gal}$ e $\rho\text{NP}\alpha\text{Ara}$. Os ensaios enzimáticos foram realizados em pH 4,5 a 60 °C por 15 minutos.

4.11 Aplicação da α -ABF na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Para avaliar o efeito da α -arabinofuranosidase purificada no aumento da taxa de hidrólise do complexo lignocelulósico, a enzima foi empregada na suplementação do coquetel comercial Multifect® CL, rico em celulasas e com baixa atividade de hemicelulasas, para sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar.

O bagaço da cana-de-açúcar, de lote RB7515, foi obtido da UEPE GCBE – Viçosa (Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Produção de Grandes Culturas e Bioenergia) e lavado com água, seco a 70 °C até peso constante e moído em moinho de facas (partículas menores que 1,0 mm). A biomassa moída foi submetida a pré-tratamento alcalino com 1,5% (p/v) de NaOH para desestruturação do material lignocelulósico, visando principalmente a remoção de lignina. O volume de NaOH utilizado foi 125 mL em frasco erlenmeyer de 250 mL para uma carga de sólidos de 10% (p/v). O material foi autoclavado por 30 minutos a 121 °C. Após esse tempo, a fração sólida foi filtrada e lavada com 375 mL de água destilada, seca e armazenada a -20 °C até o uso.

Após o pré-tratamento, a hidrólise enzimática foi realizada para o estudo da ação da α -arabinofuranosidase purificada combinada com o coquetel comercial Multifect[®] CL. A suplementação do coquetel foi feita conforme tabela 2.

Tabela 2: Experimento da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamento alcalino, utilizando coquetel enzimático comercial suplementado com α -ABF purificada de *T. pinophilus*.

Amostra	Carga de sólidos	Coquetel comercial	Suplementação
Controle negativo	2% (p/v)	-	-
Coquetel não suplementado	2% (p/v)	Multifect [®] CL (5 FPU/g)	-
Teste de suplementação	2% (p/v)	Multifect [®] CL (5 FPU/g)	α -ABF purificada (5 U/g)

A sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada como descrito por Andrade et al. (2017) com modificações. Em erlenmeyers de 25 mL, o experimento foi realizado com volume de trabalho de 2 mL, com concentração inicial de sólidos de 2% (p/v) de biomassa, em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 contendo azida de sódio (10 mM) e tetraciclina (40 mg/L) para inibir o crescimento microbiano. A carga enzimática foi especificada como 5 FPU do coquetel Multifect[®] CL por grama de bagaço pré-tratado e no teste de suplementação, além do coquetel enzimático, foi utilizado 5 U de atividade total da α -arabinofuranosidase purificada por grama de bagaço pré-tratado. A reação foi incubada sob agitação de 250 rpm a 50 °C por 72 horas. Após esse tempo, a fração líquida foi coletada e submetida a banho fervente para a desnaturação das enzimas. Posteriormente, o meio foi centrifugado por 5 minutos a 16000 x g e a fração líquida foi coletada e diluída 4 vezes com água mili-Q.

Para a quantificação de glicose, xilose e arabinose liberadas após a hidrólise, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu series 20A equipado com coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) e detector de índice de refração. Para tal, 1 mL de amostra diluída 4 vezes e filtrada em membrana de 0,45 μ m foram injetados na coluna. A eluição foi feita com H₂SO₄ 0,005 mM, em fluxo de 0,6 mL/min e operada a 65 °C. As áreas dos picos obtidos foram convertidas em concentração dos açúcares investigados, utilizando curvas padrão de glicose, xilose e arabinose. Para análise estatística dos resultados de liberação de açúcares, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com nível de significância igual a 5% ($\alpha = 0,05$)

utilizando-se o software OriginPro 8.5. As análises foram realizadas em triplicata e o desvio padrão foi calculado para todos os ensaios.

As taxas de conversão de celulose (glicana) e hemicelulose (arabinoxilana) presentes no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram calculadas pelas seguintes equações:

$$\text{Hidrólise de celulose (\%)} = \frac{[\text{Glicose liberada (g)} \times 0.90 \times 100]}{\text{Celulose da biomassa (g)}}$$

$$\text{Hidrólise de hemicelulose (\%)} = \frac{[(\text{Xilose} + \text{arabinose liberada}) \text{ (g)} \times 0.88 \times 100]}{\text{Celulose da biomassa (g)}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do secretoma experimental

A análise por LC-MS/MS do extrato bruto de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja (secretoma experimental) revelou a presença de 419 proteínas, sendo 137 delas preditas como CAZymes extracelulares (32,69%), que correspondem a 54,54% da porcentagem de sinal de íon acumulado. Dessas 137 enzimas ativas em carboidratos, 105 foram identificadas como enzimas ativas no complexo lignocelulósico. Do total de CAZymes identificados na análise, 4,15% da porcentagem de sinal de íon acumulado era referente a enzimas ativas em celulose, 48,07% a enzimas ativas em hemicelulose, 9,9% em amido, 11,72% em lignina, 21,97% em pectina, 2,74% em β -1,3 glicanas e 1,48% em outros substratos ou com funções desconhecidas (figura 8).

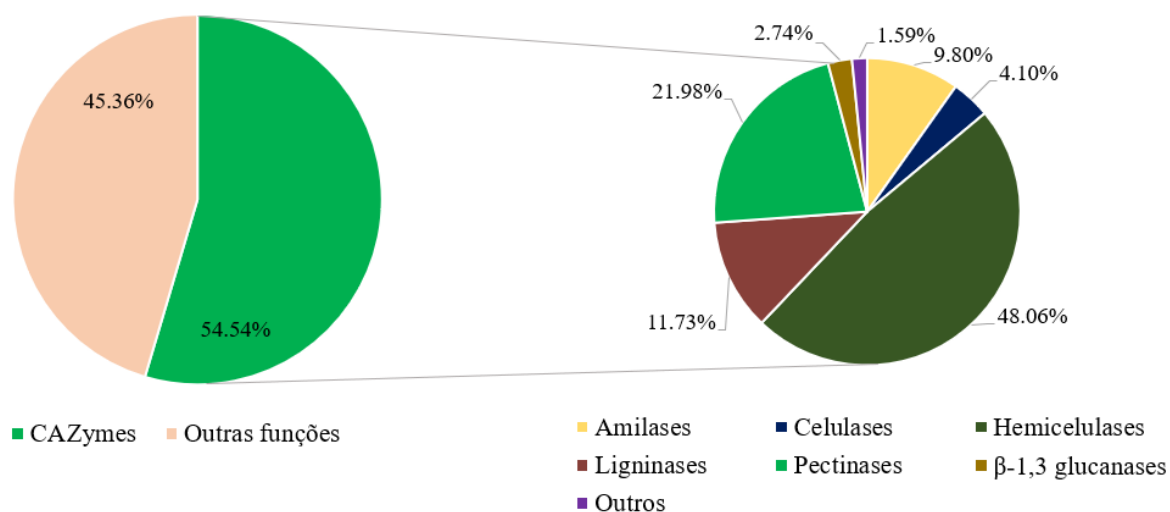


Figura 8: Análise do exoproteoma experimental de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja representadas por gráfico de setores. Porcentagem das proteínas identificadas como CAZymes e das proteínas associadas a outras funções (à esquerda) e distribuição de CAZymes de acordo com suas respectivas funções catalíticas (à direita).

O repertório de enzimas lignocelulolíticas secretadas por *T. pinophilus*, suas respectivas famílias CAZy e seus substratos estão representado na figura 9. As celulases presentes no exoproteoma de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja são divididas em 9 famílias de glicosil hidrolases. É notável que enzimas hemicelulolíticas são as mais abundantes e diversas no exoproteoma experimental, sendo divididas em 3 famílias de carboidrato esterases e 20 famílias GH. As famílias GH3, GH5 e GH30 são as únicas que agrupam celulases e hemicelulases no extrato bruto de *T. pinophilus*. As pectinases são distribuídas entre 3 famílias CE, 5 famílias GH e uma família PL. As ligninases se apresentaram em menor número e diversidade, sendo agrupadas em 5 famílias de enzimas de atividade auxiliar.

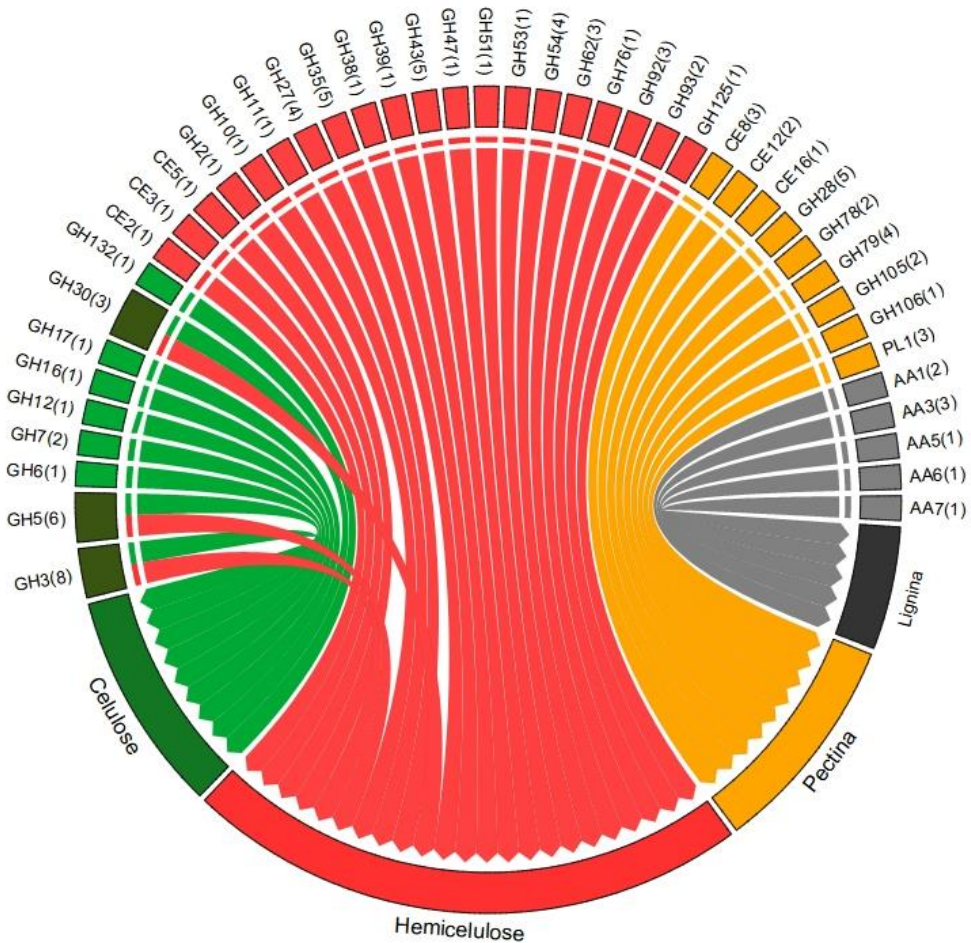


Figura 9: CAZymes presentes no exoproteoma de *T. pinophilus* de acordo com sua especificidade de substrato. A representação no diagrama de cordas indica as famílias CAZy detectadas no secretoma de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja e os principais componentes da biomassa lignocelulósica. As setas representam as enzimas com atividade sobre seus respectivos substratos: celulose (verde); hemicelulose (vermelho); pectina (laranja); lignina (cinza); e diferentes substratos (amarelo escuro).

A tabela 2 representa as 10 CAZymes mais abundantes identificadas no exoproteoma experimental de *T. pinophilus*. O maior destaque é dado a uma α -arabinofuranosidase da família GH54 (g1322.t1), que sozinha correspondeu a 19,36% da porcentagem total de sinal, destoando do restante das enzimas representadas na tabela, que não ultrapassaram 3,5%. Uma característica interessante é que todas essas proteínas apresentaram ponto isoelétrico (pI) na faixa de 4,36 a 5,13, apresentando caráter ácido. Com exceção das duas amilases, todas as outras 8 CAZymes mais abundantes são lignocelulolíticas. As enzimas que atuam na degradação do material lignocelulósico possuem uma extensa aplicabilidade biotecnológica. A grande diversidade de CAZymes produzidas por *T. pinophilus*, somado à produção direcionada de uma

α -arabinofuranosidase em alta proporção, utilizando uma condição simples de cultivo, indica que a casca de soja é uma boa fonte de nutrientes indutora para a produção de enzimas extracelulares de interesse industrial, especialmente α -arabinofuranosidasas.

Tabela 2: CAZymes mais abundantes no secretoma experimental de *T. pinophilus* com base na porcentagem de sinal de íon acumulado (> 0,1%), suas respectivas famílias CAZy, número de acesso no GenBank, massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI). ABF: α -arabinofuranosidase; RGAE: rhamnogalacturana acetilesterase; RGH: rhamnogalacturanil hidrolase; GMC: glicose-metanol-colina; CRO: cobre-radical oxidase; β -1,3-GT: β -1,3-glicanosiltransferase.

Enzima	Família CAZy	Porcentagem		Nº de acesso	MM (kDa)	pI	Classificação funcional
		de sinal de íon	acumulado				
α -ABF	GH54	19,36		KAF3405071.1	52,73	5,05	Hemicelulase
RGAE	CE12	3,43		KAF3397481.1	26,82	5,05	Pectinase
Pectinesterase	CE8	2,93		GAM33602.1	31,97	4,70	Pectinase
GMC oxidorreductase	AA3_2	2,91		PCH08568.1	62,52	4,37	Ligninase
Glicoamilase	GH15	2,84		BAN67899.1	67,89	4,78	Amilase
CRO	AA2	2,19		GAM34001.1	178,13	4,36	Ligninase
β -Galactosidase	GH35	2,16		GAM35377.1	108,31	4,97	Hemicelulase
α -Amilase	GH13_1	1,79		GAM43008.1	68,41	5,13	Amilase
α -1,2-Manosidase	GH92	1,29		GAM42992.1	96,07	4,69	Hemicelulase
Exopoligalacturonase	GH28	0,97		KAF3403042.1	46,98	4,94	Pectinase
α -Galactosidase	GH27	0,93		BAA22992.1	48,23	4,55	Hemicelulase
Pectina metilesterase	CE8	0,83		KAF3407636.1	43,60	5,22	Pectinase
Endopoligalacturonase	GH28	0,76		KAF3403303.1	37,60	6,08	Pectinase
Endoglicanase	GH12	0,71		KAF3400769.1	26,29	4,11	Celulase
Exopoligalacturonase	GH28	0,69		GAM39224.1	45,98	5,01	Pectinase
Endoglicanase	GH17	0,67		KAF3398803.1	46,21	4,34	Celulase
Lacase	AA1_3	0,66		KAF3399070.1	63,27	5,10	Ligninase
β -1,3-GT	GH72	0,57		KAF3407408.1	55,80	4,29	Quitinase
Pectina liase	PL1_2	0,55		GAM37782.1	37,52	4,70	Pectinase
α -L-ramnosidase	GH78	0,55		EEA27532.1	74,23	5,31	Hemicelulase
α -Amilase	GH15	0,50		KAF3402854.1	65,12	4,33	Amilase
α -Galactosidase	GH27	0,47		KAF3403318.1	70,52	4,65	Hemicelulase
Exoglicosidase	GH16_18	0,42		KAF3392378.1	42,79	4,39	Quitinase

GMC oxidorreductase	AA3_2	0,41	GAM42996.1	65,84	5,00	Ligninase
β -Glicosidase	GH3	0,38	KAF3404744.1	91,41	4,80	Celulase
β -Galactosidase	GH53	0,38	KAF3388023.1	74,69	6,07	Hemicelulase
α -ABF	GH62	0,34	GAM42983.1	35,59	5,04	Hemicelulase
Pectina liase	PL1_4	0,32	ABH03046.1	39,59	4,79	Pectinase
Endopoligalacturonase	GH28	0,26	KAF3395376.1	103,58	4,64	Pectinase
RGH	GH105	0,25	KAF3399136.1	40,67	5,43	Hemicelulose
β -1,3-GT	GH72	0,23	KAF3398699.1	50,83	4,49	Quitinase
α -ABF	GH62	0,18	AUG87704.1	34,61	4,83	Hemicelulase
α -1,2-manosidase	GH92	0,13	PCG98463.1	88,41	4,82	Hemicelulase
β -manosidase	GH2	0,13	KFX44216.1	158,89	4,50	Hemicelulase
β -Galactosidase	GH35	0,13	KAF3402904.1	110,39	4,98	Hemicelulase
α -1,2-manosidase	GH47	0,12	KAF3395669.1	55,16	4,39	Hemicelulase
β -Glicosidase	GH3	0,11	KAF3400770.1	84,41	4,87	Celulase
α -Glicosidase	GH31	0,11	KAF3391798.1	109,02	4,80	Hemicelulase
GMC oxidorreductase	AA3_2	0,11	PCG99791.1	66,69	5,29	Ligninase
Poligalacturonase	GH28	0,10	KAI7971201.1	126,20	5,89	Pectinase

O fungo *Aspergillus fumigatus*, que é descrito como um bom produtor de enzimas de degradação de biomassas, exibiu 78 CAZymes quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar, valor menor do que o observado no secretoma de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja (DE GOUVÊA et al., 2018). Um estudo dos secretomas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* cultivados em bagaço de cana-de-açúcar demonstrou a produção de 89 e 45 CAZymes, respectivamente, usando sistema de espectrometria de massas LTQ Velos Orbitrap (BORIN et al., 2015). Outro trabalho envolvendo estudo do secretoma de fungos filamentosos revelou a presença de 73 CAZymes no secretoma de *Ganoderma applanatum*, e 180 CAZymes no secretoma de *Pycnoporus sanguineus*, ambos cultivados em folhas de *Panicum prionitis* sob fermentação submersa e analisados em espectrômetro de massas Q-Exactive HCD Orbitrap, um instrumento mais refinado e sensível (GAUNA et al., 2020). A diferença entre o número de CAZymes reportadas na literatura indica que o conjunto de proteínas identificadas em análises dessa natureza depende não só do organismo e da fonte de carbono utilizada (JUN; KIESELBACH; JÖNSSON, 2011; VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011), mas também do instrumento de análise e dos métodos usados para a anotação dessas biomoléculas.

As atividades de enzimas lignocelulolíticas presentes no extrato bruto de *T. pinophilus* foram quantificadas e esses resultados foram integrados às informações obtidas pelas análises do exoproteoma desse fungo (tabela 3).

Tabela 3: Atividades das enzimas presentes no extrato bruto de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja sob fermentação submersa e seus valores, em porcentagem, de intensidade de sinal relativa.

Enzima	Atividade enzimática (U/mL)	Nº de membros distintos	Família CAZy	Porcentagem de sinal de íon acumulado
Endoglicanase	2,179 ± 0,009	10	GH5, GH7, GH12, GH16, GH17, GH30	1,599
Xilanase	1,337 ± 0,035	3	CE3, GH10, GH11	0,007
Poligalacturonase	16,833 ± 0,890	5	GH28	2,616
Mananase	3,729 ± 0,069	8	GH2, GH5, GH38, GH47, GH76, GH92, GH125	1,576
α-Arabinofuranosidase	0,275 ± 0,011	13	GH43, GH51, GH54, GH62, GH93	20,45
α-Galactosidase	0,016 ± 0,002	4	GH27	1,402
β-Galactosidase	0,372 ± 0,003	7	GH30, GH35, GH53	2,734
β-Xilosidase	0,064 ± 0,002	4	GH3, GH43	0,146
β-Glicosidase	0,161 ± 0,015	7	GH3, GH132	0,580
Celobiohidrolase	< 0,001	2	GH6, GH7	0,002
α-Amilase	0,050 ± 0,005	8	GH13, GH15, GH 31	5,340
Lacase	< 0,001	2	AA1	1,33

A análise da composição centesimal da casca de soja foi feita com o intuito de avaliar uma possível relação entre o perfil de enzimas secretadas pelo fungo e as concentrações dos componentes da biomassa utilizada no cultivo do fungo (tabela 4).

Tabela 4: caracterização centesimal da casca de soja (em %).

Casca de soja						
Celulose	Hemicelulose	Lignina	Proteínas	Cinzas	Extrativos	Total
23,31 ± 1,01	20,01 ± 0,34	12,50 ± 0,86	17,14 ± 0,05	4,27 ± 0,05	15,72 ± 0,55	92,97

Como a casca de soja possui 23,31% de celulose, o componente mais abundante dessa biomassa, era esperado que o fungo produzisse altas quantidades celulasas, mas apenas 4,10% do total de intensidade de sinal foi observado para essas enzimas, cobrindo dez endoglicanases,

que juntas exibiram atividade de 2,18 U/mL; duas celobiohidrolases, que exibiram atividade de 0,002 U/mL e; sete β -glicosidasas, que exibiram atividade de 0,161 U/mL. É possível que no tempo de cultivo de 7 dias sob fermentação submersa o metabolismo de *T. pinophilus* seja direcionado para a produção de enzimas que atuem na degradação da hemicelulose, para que depois produza maiores quantidades de celulases, mas isso só pode ser comprovado avaliando o secretoma do fungo com maiores tempos de cultivo. Apesar dos baixos valores detectados de porcentagem de sinal de íon acumulado às celulases e atividade celulolítica no extrato fúngico, a presença de vinte e uma celulases demonstra a capacidade de *T. pinophilus* de secretar um arsenal diverso de enzimas celulolíticas.

Enzimas ativas em hemicelulose corresponderam ao maior grupo de CAZymes identificadas no secretoma experimental, totalizando 48,06% da porcentagem de sinal de íon acumulado. Apenas quatro xilanases foram identificadas no secretoma experimental, que juntas totalizaram 0,007% da intensidade de sinal e apresentaram atividade de 1,34 U/mL, sendo elas uma endoxilanase da família GH10 (g5728.t1), uma endoxilanase da família GH11 (g2462.t1) e duas acetilxilana esterases das famílias CE3 (g2286.t1) e CE5 (g6671.t1). Um estudo anterior já demonstrou que *T. pinophilus*, quando cultivado em capim elefante sob fermentação submersa, produzia quantidades superiores de xilanase, com atividade de 22,77 U/mL (VISSER et al., 2013). Uma maior produção de xilanases também foi observada por outros fungos do gênero *Talaromyces*, que são filogeneticamente próximos de *T. pinophilus*, como *Talaromyces amestolkiae*, que apresentou atividade de xilanase de 5,41 U/mL quando cultivado em farelo de trigo (BARBIERI et al., 2022) e *Talaromyces stollii* LV186, que apresentou atividade de xilanase de 7,53 U/mL quando cultivado em palha de milho (ORENCIO-TREJO et al., 2016). Comparado a esses trabalhos, é possível afirmar que a casca de soja não é uma boa indutora da produção de xilanases por *T. pinophilus*.

A alta concentração de hemicelulose na casca de soja, 20,01% (tabela 4), pode ter induzido a secreção de uma vasta diversidade de hemicelulases por *T. pinophilus*. Foram detectados pelo menos seis α -manosidasas distribuídas nas famílias GH38 (g10317.t1), GH47 (g3939.t1), GH76 (g6956.t1), GH92 (g3310.t1 e g1757.t1) e GH125 (g2413.t1). Duas β -manosidasas também foram identificadas, sendo uma da família GH2 (g2928.t1) e outra da família GH5 (g10782.t1). A atividade total de mananase detectada no extrato bruto de *T. pinophilus*, considerada como a soma das atividades dessas enzimas atuando em conjunto, foi de 3,729 U/mL, apesar de nenhuma endo-1,4- β -mananase (EC 3.2.1.78) ter sido identificada na análise. Isso sugere a existência de alguma enzima com atividade de mananase no extrato

bruto, mas não identificada pela análise espectrométrica ou pelas ferramentas de anotação. As mananases atuam na liberação de resíduos de β -D-manose ligados a polissacarídeos presentes na hemicelulose, sobretudo nas cadeias de manana, enquanto as manosidases atuam sobre oligômeros contendo resíduos de manose, que comumente estão presentes como grupos substituintes na hemicelulose, caracterizando-as como enzimas acessórias essenciais para a despolimerização do complexo (HOUFANI et al., 2020).

Outras enzimas acessórias que atuam na hemicelulose também foram identificadas. Quatro α -galactosidases da família GH27 (g4697.t1, g7646.t1, g4105.t1 e g2131.t1), que exibiram atividade enzimática de 0,016 U/mL; e sete β -galactosidases, pertencentes às famílias GH30 (g594.t1), GH35 (g7358.t1, g3969.t1, g4417.t1, g6258.t1 e g2991.t1) e GH53 (g10246.t1), que exibiram atividade enzimática de 0,372 U/mL. As α e β -galactosidases atuam da hidrólise de ligações glicosídicas entre resíduos de α -D-galactose e β -D-galactose, respectivamente, ligadas a oligo ou polissacarídeos como a arabinoxilana, altamente abundante na hemicelulose da casca de soja (LIU; LI, 2017). A vasta diversidade de galactosidases no secretoma de *T. pinophilus* consolida o seu potencial na produção de enzimas acessórias que aumentam a taxa de hidrólise de biomassas lignocelulósicas.

As arabinofuranosidases, associadas a 13 diferentes enzimas pertencentes às famílias GH43 (g2132.t1, g5620.t1 e g10926.t1), GH51 (g10781.t1), GH54 (g1322.t1, g3412.t1, g8077.t1 e g10983.t1), GH62 (g3299.t1, g1599.t1 e g7360.t1) e GH93 (g8044.t1 e g4240.t1), corresponderam a 20,45% do total de intensidade de sinal no secretoma experimental, sendo a α -arabinofuranosidase g1322.t1 a mais abundante, que representou 19,36%. As arabinofuranosidases são importantes enzimas acessórias que auxiliam na despolimerização da hemicelulose suas aplicações biotecnológicas são amplamente descritas na literatura. Apesar da alta diversidade e abundância dessas enzimas no exoproteoma experimental, a atividade de α -arabinofuranosidase detectada no extrato bruto foi de 0,275 U/mL. Isso sugere que a porcentagem de sinal de íon acumulado não deve ser relacionada com a atividade enzimática. De fato, existem fatores intrínsecos e extrínsecos que podem afetar a atividade enzimática, como as propriedades inerentes a cada enzima, a presença de componentes no extrato bruto que afetam ou levam à inativação da enzima (como proteases ou moduladores negativos), eventuais modificações pós-traducionais que afetam a função catalítica, como glicosilações, e a ação sinérgica com outras enzimas presentes no extrato enzimático. Além disso, os ensaios enzimáticos foram todos realizados a 50 °C e pH 5, que podem não ser as condições de maior atividade das enzimas avaliadas.

Por outro lado, o extrato bruto de *T. pinophilus* apresentou alto valor de atividade de poligalacturonase (16,83 U/mL) e no secretoma experimental, foram identificados cinco poligalacturonases pertencentes à família GH28 (g7253.t1, g7779.t1, g928.t1, g2639.t1 e g6972.t1) que, em conjunto, acumulavam somente 2,61% do total da intensidade de sinal. A baixa porcentagem de sinal relativo às poligalacturonases, quando comparada com outras enzimas detectadas no secretoma, sugere que essas possam apresentar uma alta capacidade catalítica, o que as tornam interessantes para estudos futuros. Em complemento, outras enzimas ativas em pectina foram detectadas na análise: uma pectinesterase (g8035.t1) e duas pectina metil esterases (g6978.t1 e g5432.t1) da família CE8; duas rhamnogalacturana acetil esterases da família CE12 (g10706.t1 e g9786.t1) e uma acetil esterase da família CE16 (g2054.t1), que atuam na remoção ligações *N*- ou *O*-acetil a polissacarídeos presentes na pectina; uma pectina liase (g6942.t1) e duas pectato liases (g10434.t1 e g10993.t1) da família PL1, que atuam na remoção de ácidos urônicos presentes na pectina por mecanismos de β -eliminação. Das glicosil hidrolases, família que mais abrange enzimas pectinolíticas no extrato bruto de *T. pinophilus*, foram detectadas três α -L-rhamnosidase das famílias GH78 (g5781.t1, g927.t1) e GH106 (g2816.t1), quatro β -glicuronidasas da família GH79 (g4400.t1, g7895.t1, g6841.t1 e g2940.t1) e três rhamnogalacturonil hidrolases da família GH105 (g4750.t1 e g6941.t1). Essas enzimas, em conjunto, atuam na degradação de pectinas que podem estar associadas às fibras de celulose, tornando-as mais acessíveis às enzimas celulolíticas e aumentando a taxa de liberação de glicose (BERLIN et al., 2007). Pelo mesmo motivo, pectinases são usadas em coquetéis enzimáticos aplicados na produção de bioetanol (WANG et al., 2019).

Foram identificadas 8 enzimas de atividade auxiliar no secretoma de *T. pinophilus*, sendo duas lacases da família AA1 (g6959.t1 e g3494.t1), uma cobre-radical oxidase (CRO) da família AA5 (g11091.t1), três glicose-metanol-colina (GMC) oxidases da família AA3 (g10905.t1, g3315.t1 e g7832.t1), uma glico-oligossacarídeo oxidase da família AA7 (g5673.t1) e uma 1,4-benzoquinona redutase da AA6 (g6891.t1). As lacases são comumente descritas como as ligninasas de maior interesse industrial, pois são capazes de oxidar uma grande diversidade de formas poliméricas de lignina sem necessitar de um cofator adicional, liberando água como único subproduto (MOROZOVA et al., 2007). A CRO encontrada no secretoma pertencente à subfamília 1 da família AA5 promove a oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos ao mesmo tempo que reduz O_2 a H_2O_2 , sendo importante para a oxidação de monômeros presentes na lignina, como o hidroximetil furfural (GRANJA-TRAVEZ et al., 2018). As GMC oxidases presentes no secretoma são todas pertencentes à subfamília 2 da

família AA3 e apresentam atividade de aril-álcool oxidases e glicose desidrogenases (SÜTZL et al., 2019). As glico-oligosacarídeo oxidases atuam na oxidação do carbono anomérico da β -D-glicose usando um oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, numa reação que produz H_2O_2 e D-glicano- δ -lactona que, na presença de água, é convertida em ácido glicurônico. O peróxido gerado como subproduto da reação enzimática pode ser usado como cofator para outras enzimas de degradação da lignina, como as LPMOs (VUONG et al., 2013).

Foi observado um baixo número de enzimas lignolíticas presentes no exoproteoma de *T. pinophilus*, assim como um baixo valor de atividade de lacase no extrato fúngico, apesar de o teor de lignina na casca de soja ter sido de 12,50%. O único estudo encontrado na literatura com foco para a produção de lacases por *T. pinophilus* foi realizado por Dhakar et al. (2014), que utilizaram uma cepa do fungo resistente a frio e a altos valores de pH, em que foi observado uma maior produção após 28 dias de cultivo em meio complexo contendo frutose, nitrato de potássio e outros suplementos nutricionais, exibindo atividade de 11,6 U/mL. Isso demonstra a necessidade de uma condição muito específica e um longo período de cultivo para estimular uma alta produção dessas enzimas.

Ainda, a análise do secretoma mostrou a presença de enzimas de degradação de amido, como uma α -amilase da família GH13 (g3327.t1), duas α -1,4-glicosidases da família GH15 (g7679.t1 e g7662.t1) e quatro α -glicosidases da família GH31 com capacidade de atuar em β -ligações (g10102.t1, g8062.t1, g3326.t1 e g50.t1). Entretanto, a atividade de α -amilase observada no extrato bruto foi de apenas 0,005 U/mL. Quanto às enzimas de degradação de quitina, foram identificadas uma exo- β -D-glicosaminidase da família GH2 (g156.t1), quatro β -1,3/1,6-glicanosiltransferases da família GH16 (g3579.t1, g5422.t1, g3086.t1 e g6425.t1) e três endoquitinases da família GH18 (g7024.t1, g9705.t1 e g864.t1). Por fim, das enzimas ativas em glicanas do tipo β -1,3, foram detectadas quatro exo- β -1,3-glicosidases da família GH55 (g4320.t1, g8090.t1, g10731.t1 e g2993.t1) e três 1,3- β -glicanosiltransferases da família GH72.

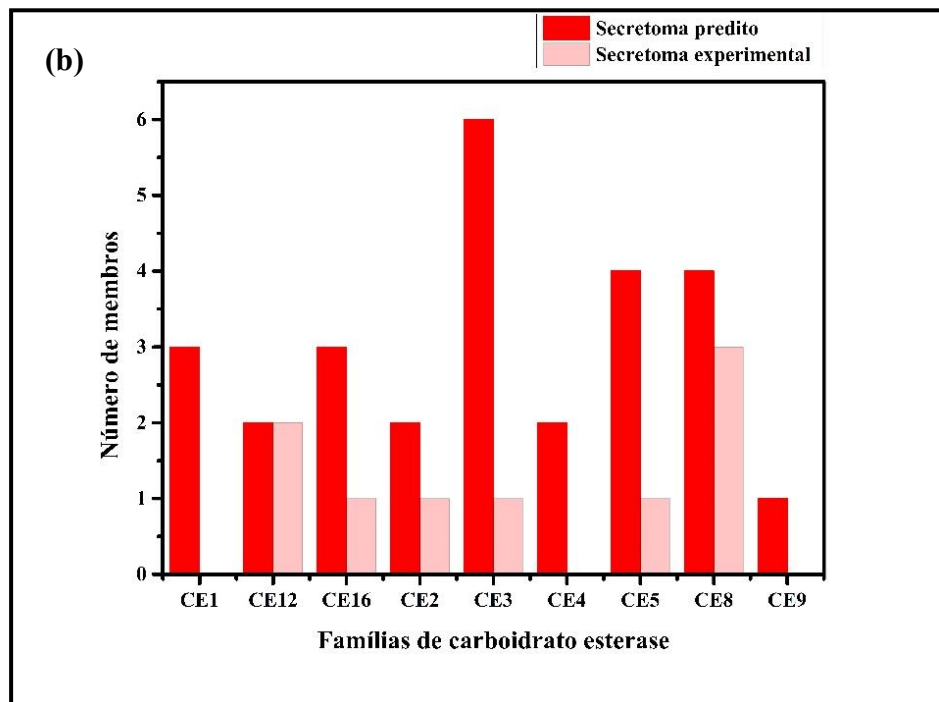
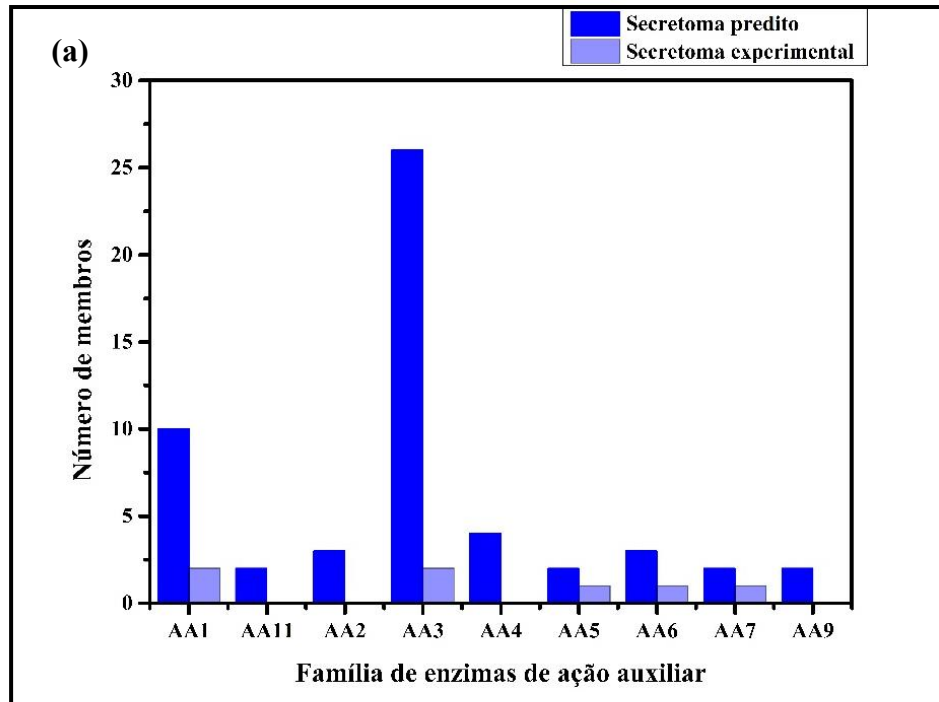
5.2 Predição de CAZymes extracelulares baseada no genoma de *T. pinophilus*

A análise do secretoma experimental forneceu informações relevantes a respeito do repertório proteico secretado por *Talaromyces pinophilus* quando cultivado em casca de soja. Essa análise permitiu demonstrar o potencial da biomassa como indutora para a produção de enzimas de degradação de carboidratos pelo fungo. Por outro lado, a predição das CAZymes possivelmente secretadas por *T. pinophilus* baseada em seu genoma fornece informações mais

amplas que demonstram o potencial deste organismo em produzir enzimas de interesse biotecnológico, como aquelas aplicadas na sacarificação de biomassas lignocelulósicas, sem envolver uma condição de cultivo específica.

A anotação funcional do proteoma predito de *T. pinophilus* revelou a presença de 547 genes codificadores de CAZymes do total de 11095 genes putativos deste fungo, com base nos bancos de dados do dbCAN2 e RefSeq. Esse valor difere dos resultados encontrados por Li, et al. (2017) em razão das diferentes abordagens computacionais utilizadas para a anotação gênica e predição das proteínas secretadas. A análise no pacote DeepLoc2 indicou que 295 dessas CAZymes seguem a via clássica de secreção, possuindo pelo menos um peptídeo-sinal, enquanto a análise no servidor SecretomeP v.2 revelou que outras 156 CAZymes seguem as vias não clássicas de secreção (ou seja, sem a presença de peptídeo-sinal), totalizando 451 CAZymes possivelmente secretadas. O total de 451 enzimas ativas em carboidratos presentes no secretoma predito corresponde a 4,06% dos genes totais do organismo e 82,45% do total de genes codificadores de CAZymes. Isso demonstra que a maior parte das enzimas ativas em carboidratos produzidas por *T. pinophilus* são exportadas para o meio extracelular. O número de CAZymes potencialmente secretadas por *T. pinophilus* supera o fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis*, eficiente na produção de enzimas envolvidas na sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar, cujo a análise do bioinfosecretoma revelou ser igual a 274 (TAVARES et al., 2021).

A comparação entre as CAZymes extracelulares preditas com base no genoma de *T. pinophilus* e as CAZymes identificadas no seu secretoma experimental quando cultivado em casca de soja estão representadas na figura 10. A predição revelou que as enzimas estão distribuídas em 86 famílias CAZy distintas, sendo elas: enzimas de atividade auxiliar, carboidrato esterases, polissacarídeo liases e glicosil hidrolases, sendo a última a mais abundante.



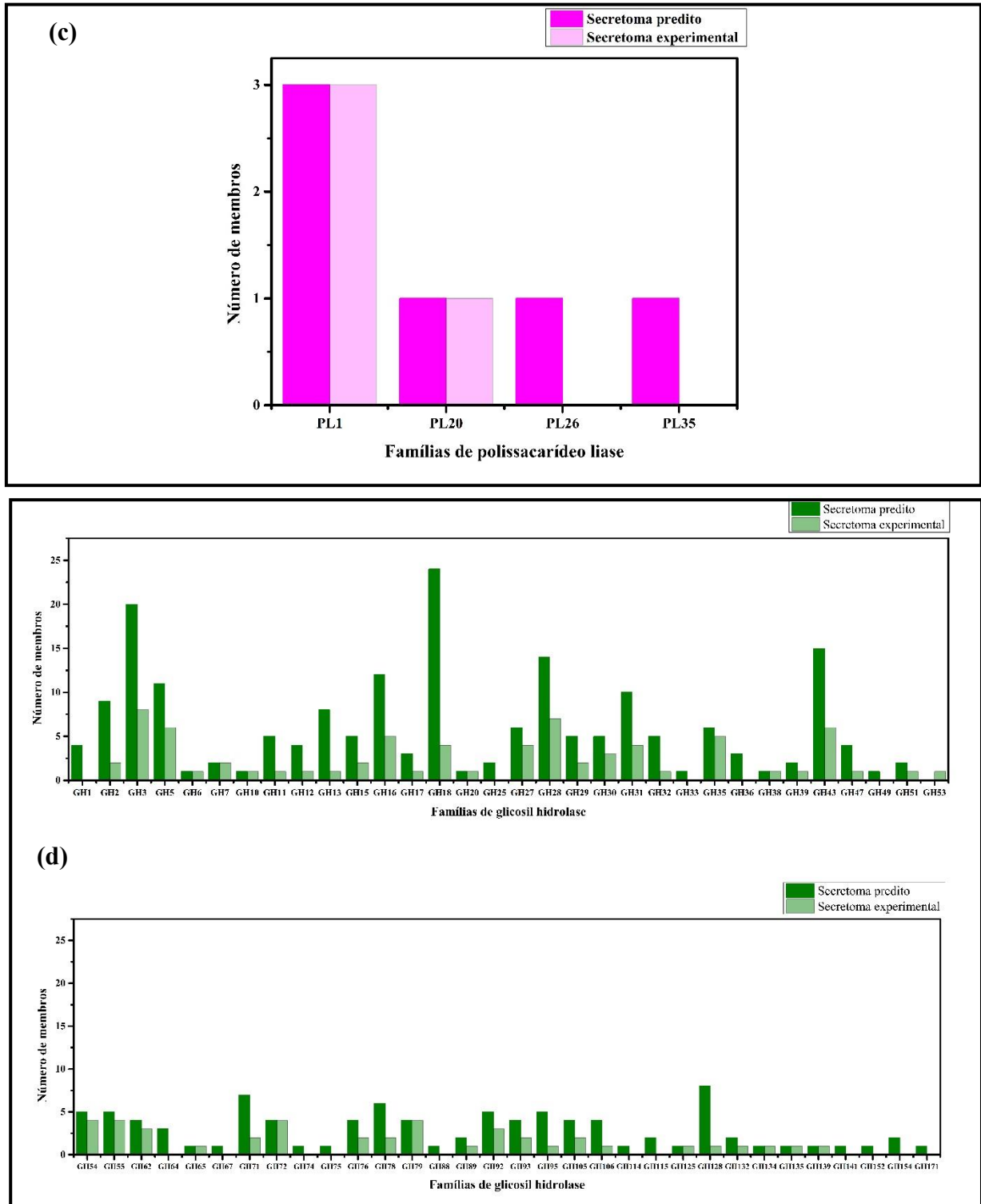


Figura 10: Distribuição das CAZymes potencialmente secretadas e das CAZymes presentes no secretoma experimental de *T. pinophilus* de acordo com as famílias AA (a), CE (b), PL (c) e GH (d).

Da família de enzimas de atividade auxiliar, 54 proteínas foram identificadas na análise de predição, enquanto apenas 8 foram identificadas no secretoma experimental, o que equivale

a 14% (figura 10a). Isso confirma que a casca de soja não parece induzir a produção de enzimas atuantes na degradação da lignina – as mais abundantes dessa classe – o que pode estar relacionado ao baixo teor de lignina presente na biomassa (tabela 4), visto que o fungo abriga genes que codificam proteínas envolvidas da degradação desse biopolímero. Enzimas das famílias AA2, AA4, AA9 e AA11, presentes no secretoma predito, não foram detectadas no secretoma experimental. Foram identificadas duas mono-oxidases líticas de polissacarídeos (LPMOs) no proteoma predito de *T. pinophilus*, que são oxidases dependentes de cobre que atuam na degradação de polissacarídeos como a celulose, sendo essas especialmente atrativas para a sacarificação de biomassas vegetas. No entanto, as únicas LPMOs identificadas na análise de predição pertencem à família AA11 e atuam em quitina.

Vinte e sete enzimas da família carboidrato esterase foram detectadas no secretoma predito, das quais apenas 9 foram identificadas no secretoma experimental (figura 10b), correspondendo a 30%. As enzimas pertencentes a essa família possuem ação em substratos diversos, catalisando a desacetilação de grupos *-O* ou *-N* ligados a sacarídeos diversos, principalmente nas cadeias de arabinoxilana, pectina, quitina e ácidos hidroxicinâmicos (TOPAKAS & PAUL, 2007). Membros pertencentes a essa classe também apresentam sinergia com glicosil hidrolases por facilitarem o acesso dessas enzimas a carboidratos complexos de biomassas lignocelulósicas (ARMENDÁRIZ-RUIZ et al., 2018).

A família CAZy menos abundante predita com base no genoma de *T. pinophilus* é a polissacarídeo liase, que abriga 6 membros, dos quais 4 foram observados no secretoma experimental (figura 10c). As enzimas da família PL26 e PL35, ausentes no extrato bruto, correspondem a uma rhamnogalacturana exoliase e uma condroitina sulfato liase. A primeira atua na β -eliminação de resíduos de galactose presentes nas cadeias de rhamnogalacturana da pectina, sendo considerada uma pectinase. A última é encontrada principalmente em bactérias e atua na β -eliminação de grupos condroitina, estando relacionada com a patogenicidade desses organismos, que invadem seus hospedeiros por mecanismos de degradação dos tecidos constituídos por glicosaminoglicanos (FAN et al., 2022). O restante das enzimas é pertencente à classe PL1, que atuam sobre a pectina, e à classe PL20, que atuam sobre a celulose.

A família de glicosil hidrolases, como o esperado, foi a mais abundante tanto no secretoma predito quanto no secretoma experimental. A análise de predição baseada no genoma de *T. pinophilus* demonstrou a presença de 288 enzimas distribuídas em 64 diferentes famílias GH, desconsiderando as 4 enzimas que foram identificadas como pertencentes à classe GH0, que não possuem função definida. No secretoma experimental, foram encontradas 115 enzimas

das famílias GH, o que corresponde a 39,93%. Membros de 15 famílias GH (GH1, GH25, GH33, GH36, GH49, GH64, GH67, GH74, GH75, GH88, GH114, GH115, GH141, GH152, GH154 e GH171) não foram detectadas no extrato bruto de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja.

As famílias GH mais abundantes preditas com base no genoma de *T. pinophilus* foram GH3, GH16, GH18, GH28 e GH43 e com 20, 12, 24, 14 e 15 membros, respectivamente. No secretoma experimental, essas mesmas famílias possuem 8, 5, 4, 7 e 6 membros, respectivamente.

Das 20 proteínas preditas para família GH3, 13 correspondem a β -glicosidase, das quais 6 foram observadas no secretoma experimental. As β -glicosidases desempenham papel importante na desconstrução da celulose, uma vez que atuam na hidrólise da celobiose, dissacarídeo liberado pela ação de endoglicanases e que inibe a atividade de outros tipos de celulases (GRUNO et al., 2004). Preparações enzimáticas ricas em celulases, principalmente derivadas de *Trichoderma sp.*, gênero que se destaca pela produção de enzimas lignocelulolíticas, apresentam uma defasagem de β -glicosidases, o que limita a taxa de despolimerização da celulose (BAI et al., 2013). Apesar de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* se destacarem pela produção dessa enzima, já existem estudos recentes que mostram fungos do gênero *Talaromyces* ganhando destaque para a sua produção, como o fungo *T. amestolkiae* que apresentou atividade de β -glicosidase igual a 11 U/mL quando cultivado em glicerol, mostrando-se uma alternativa promissora para a produção dessa enzima (MÉNDEZ-LÍTER et al., 2021).

Glicosil hidrolases da família 16 possuem atividades em substratos diversos como queratan-sulfato, quitina, ácidos hialurônicos e outros componentes ausentes ou em baixas concentrações em biomassas vegetais. Isso possivelmente explica a baixa presença de enzimas dessa família no secretoma experimental, que foram apenas 5 das 12 preditas. Pelo mesmo motivo, a família GH18, que também abriga enzimas ativas em quitina e peptidoglicanos, apresentou 24 membros na análise de predição, mas no secretoma experimental foram encontrados apenas 4. Em fungos, de forma geral, essas enzimas estão associadas ao remodelamento da parede celular.

Pectinases que atuam por mecanismos de hidrólise compõem a família GH28. Dos 14 membros preditos para essa família no genoma de *T. pinophilus*, destaca-se a presença de 7 poligalacturonases e 4 rhamnogalacturonases. No secretoma experimental, 5 poligalacturonases

e duas rhamnogalacturonases foram detectadas. A atividade de poligalacturonase encontrada no extrato bruto de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja (tabela 3) se destaca por ter sido a maior dentre todas as atividades avaliadas. A investigação do potencial pectinolítico do fungo cultivado nesta condição pode consolidá-lo como uma fonte promissora para a produção de pectinases.

A família GH43 é constituída por uma ampla gama de arabinofuranosidases, xilosidases, xilanases e galactanases, enzimas que atuam na despolimerização da hemicelulose. Das 16 proteínas preditas para essa classe com base no genoma de *T. pinophilus*, 6 foram encontradas em seu secretoma experimental, sendo 3 arabinofuranosidases, duas β -xilosidases e uma galactanase. No entanto, todas essas proteínas exibiram um valor de porcentagem de sinal de íon acumulado inferior a 0,04%, o que indica uma baixa atuação dessas nas rotas de desconstrução do material lignocelulósico proporcionada pelo fungo.

O banco de dados CAZy reporta a presença de xilanases nas famílias GH5, GH8, GH10, GH11, GH30, GH43, GH62 e GH98 (MALGAS et al., 2021), enquanto as xilosidases são reportadas nas famílias GH3, GH30, GH39, GH43, GH52, GH54, GH116 e GH120 (LAGAERT et al., 2014). Como observado no secretoma experimental e nos ensaios enzimáticos (tabela 3), o extrato bruto de *T. pinophilus* apresentou baixa atividade para ambas as enzimas e foram detectados apenas dois tipos de xilanase e dois tipos de β -xilosidase, que acumularam menos que 0,15% da porcentagem de sinal de íon acumulado das proteínas identificadas na espectrometria. No entanto, 12 diferentes xilanases e 16 diferentes xilosidases da família de glicosil hidrolases foram identificadas no secretoma predito de *T. pinophilus*, o que corrobora a hipótese que o fungo apresenta capacidade de secretar uma alta diversidade de enzimas de degradação de xilana, mas utilizando outros métodos de cultivo.

De acordo com a predição das CAZymes extracelulares, o fungo *T. pinophilus* abriga 18 genes putativos que codificam arabinofuranosidases que são potencialmente secretadas, pertencentes às famílias GH43, GH51, GH54, GH62 e GH93. Dessas 18 enzimas, 13 foram detectadas no extrato bruto, pertencentes às mesmas famílias GH, correspondendo a 72,22%. Esses resultados mostram que a casca de soja induz não só a produção de uma grande diversidade de arabinofuranosidases pelo fungo *T. pinophilus*, mas também a produção direcionada da α -arabinofuranosidase da família GH54 em grande abundância.

5.3 Identificação molecular

A região ITS do rDNA foi sequenciada para a identificação do microrganismo utilizado neste trabalho. Por meio da utilização dos iniciadores ITS1 e ITS4 o produto amplificado da região ITS gerou um fragmento de aproximadamente 600 pb (figura 11).

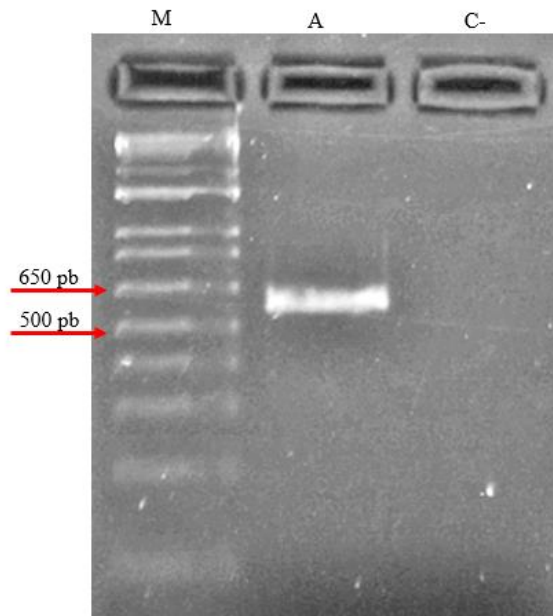


Figura 11: Produto de amplificação por PCR do DNA genômico em gel de agarose de 1% do isolado de *T. pinophilus*, utilizando os primers ITS1 e ITS4. M: Marcador de peso molecular (1 kb Invitrogen Plus); A: DNA genômico de *T. pinophilus*; C-: controle negativo (sem Taq Polimerase).

O espaçador interno transcrito (ITS) intercala regiões dos genes que codificam as subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico e pode ser utilizado para identificar gênero ou espécie de fungos (O'BRIEN et al., 2005). As regiões ITS1 e ITS4 apresentam entre 600 e 800 pb (GARDES; BRUNS, 1993), portanto o tamanho estimado para a região amplificada está de acordo com o que é descrito na literatura.

A sequência consenso, elucidada e curada manualmente para a remoção de nucleotídeos em posições ambíguas ou sinais de baixa resolução no programa SeqAssem, gerou um *contig* de 548 pb. Este *contig* foi analisado por alinhamento com outras sequências depositadas no GenBank usando o pacote BLAST e as principais correspondências são descritas na tabela 5. As sequências com maior porcentagem de identidade são referentes a isolados de espécies do gênero *Talaromyces*, confirmando que o microrganismo utilizado neste trabalho é *T. pinophilus*.

Tabela 5: As sequências de *Talaromyces* spp ordenados pelos valores de *score* após alinhamento com a sequência da região ITS de *Talaromyces pinophilus*. A maioria das sequências alvo eram de isolados de *T. pinophilus*.

Nome científico	Score	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de acesso no GenBank
<i>Talaromyces pinophilus</i>	1005	100	99,82	MT152340.1
<i>Talaromyces pinophilus</i>	1005	100	99,82	MT093464.1
<i>Talaromyces pinophilus</i>	1005	100	99,82	MN587879.1
<i>Talaromyces pinophilus</i>	1005	100	99,82	MN486547.1
<i>Talaromyces pinophilus</i>	1005	100	99,82	MF495376.1

5.4 Purificação da α -ABF da família GH54 de *T. pinophilus*

Para estudar as propriedades bioquímicas da α -arabinofuranosidase da família GH54 (número de acesso: KAF3405071.1), o extrato bruto de *T. pinophilus* cultivado em casca de soja foi parcialmente purificado como descrito no item 4.8. Conforme já discutido na análise do secretoma, a enzima é produzida pelo fungo e exportada para o meio extracelular em grande abundância (19,36% da intensidade de sinal), o que permitiu que uma estratégia mais simples de purificação fosse adotada para a separação dessa proteína das outras presentes no extrato bruto. As etapas de purificação estão representadas na tabela 5.

Tabela 5: Tabela de purificação da α -arabinofuranosidase produzida pelo fungo *Talaromyces pinophilus* cultivado em casca de soja por fermentação submersa durante 7 dias.

Etapa	Volume (mL)	α -arabinofuranosidase						
		Atv. enzimática (U/mL)	U total	Proteína (mg/mL)	Proteínas total (mg)	Atv. específica (U/mg)	FP (x)	Rendimento (%)
EB	25	0,52	13	0,20	5	2,6	1	100
Ultrafiltração	7	1,28	8,96	0,31	2,17	4,06	1,56	68,92
Troca iônica	3,5	0,226	0,791	0,012	0,042	18,83	7,24	6,08

O extrato bruto inicialmente apresentou atividade total de 13 U (0,52 U/mL). A primeira etapa de purificação consistiu em uma ultrafiltração utilizando sistema de membranas de celulose retentoras de moléculas com massa molecular superior a 3 kDa. Além de separar eventuais peptídeos e outros componentes de baixo peso molecular que poderiam estar presentes na amostra, as membranas de celulose são capazes de reter celulasas pela interação dessas enzimas com o material, reação que se assemelha a uma imobilização (KNUTSEN; DAVIS, 2004). Esse mesmo princípio já vem sendo utilizado para reuso de celulasas após a sacarificação, ou ainda para separação dos produtos e subprodutos gerados na reação sem haver, contudo, a perda das enzimas (AL-MARDEAI et al., 2022). Como o objetivo da purificação era manter apenas a α -arabinofuranosidase, as celulasas retidas foram desprezadas. A amostra foi concentrada em 3,57 vezes e apresentou baixa perda atividade de total, mantendo 8,96 U (1,28 U/mL). Em contraste, a quantidade de proteínas totais no extrato bruto era equivalente a 5 mg e na amostra concentrada foi reduzida para 2,17 mg, mostrando que a ultrafiltração foi capaz de separar a enzima de interesse, levando a uma queda de mais da metade das proteínas totais.

Na segunda etapa de purificação, a amostra concentrada foi diluída em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 e aplicada à coluna DEAE-Sepharose para a cromatografia de troca iônica. Nesse valor de pH, a enzima α -arabinofuranosidase encontra-se carregada negativamente, uma vez que o seu pI equivale a 5,05, possibilitando que ela interaja com as cargas positivas da fase estacionária. O perfil cromatográfico está representado na figura 12.

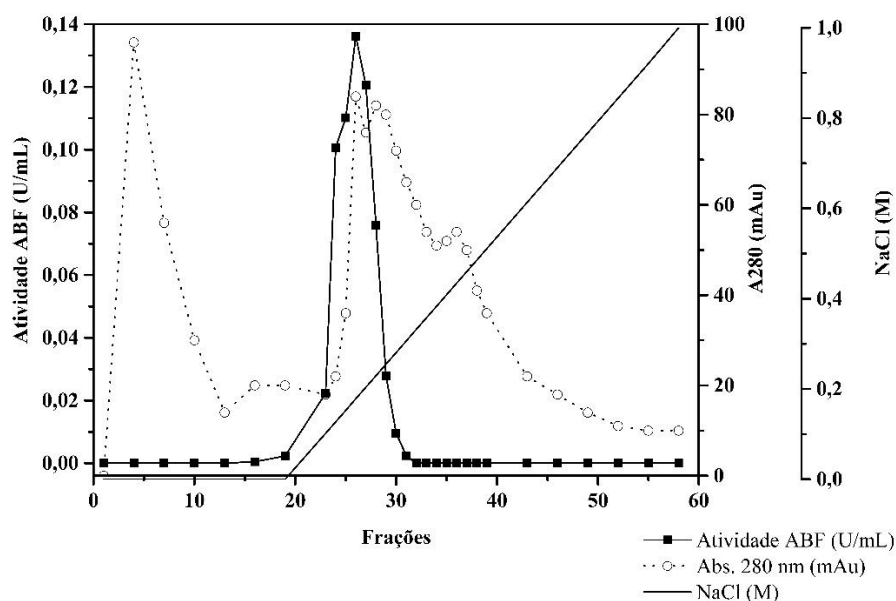


Figura 12: Perfil cromatográfico da troca iônica, em coluna DEAE-Sepharose, da amostra contendo a α -arabinofuranosidase de *Talaromyces pinophilus* proveniente da etapa de concentração da amostra em sistema de ultrafiltração.

Pela análise do perfil cromatográfico é possível observar a presença de um único pico de atividade de α -arabinofuranosidase, relativos às frações 16 a 31, sendo os maiores valores encontrados nas frações 24 a 27. Por outro lado, observa-se pelos picos relativos às proteínas, quantificadas pela absorbância a 280 nm, que essas foram eluídas ao longo de toda corrida cromatográfica, antes e após o gradiente de NaCl. As frações com maior atividade de α -arabinofuranosidase foram coletadas, agrupadas e utilizadas nos ensaios de caracterização enzimática e os testes de sacarificação. A fração que apresentou maior atividade foi usada na análise de especificidade de substrato e na análise eletroforética SDS-PAGE.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida, amostras de cada etapa da purificação foram utilizadas para avaliar o grau de pureza ao final do processo e o resultado está representado na figura 13.

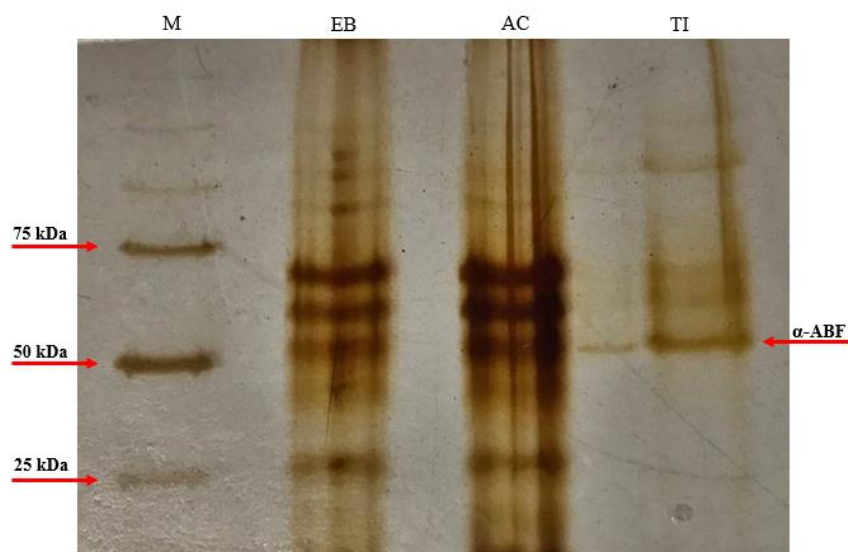


Figura 13: SDS-PAGE corado com nitrato de prata de cada uma das etapas de purificação da α -arabinofuranosidase de *T. pinophilus*. MM: marcador de massa molecular; EB: extrato bruto; AC: amostra concentrada por ultrafiltração; TI: amostra proveniente da cromatografia de troca iônica. A banda destacada pela seta vermelha à direita sugere a presença da α -ABF da família GH54 de *T. pinophilus*, que possui massa molecular de aproximadamente 52 kDa.

O padrão de bandas proteicas do extrato bruto e da amostra concentrada se assemelharam, contendo três bandas proteicas fortes na região entre 50 e 75 kDa. Já na canaleta referente à amostra purificada por troca iônica, é possível observar uma banda proteica forte próxima a 50 kDa, enquanto as outras bandas apareceram mais fracas. A banda proteica próxima a 50 kDa possivelmente representa a α -arabinofuranosidase, uma vez que sua massa molecular predita com base na sequência de aminoácidos é 52 kDa. Esse valor está próximo de outras arabinofuranosidasas já caracterizadas da família GH54, como aquela codificada pelo gene *abfI* do fungo *Penicillium purpurogenum*, que possui uma massa molecular de aproximadamente 49,6 kDa (CARVALLO et al., 2003) ou como o produto de expressão do gene *abfB* de *Aspergillus niger*, que possui massa molecular de 50,7 kDa (FLIPPPI et al., 1993). É válido ressaltar que nem todas as ABFs pertencentes à família GH54 encontram-se nessa faixa de massa molecular, como exemplo do estudo de Nogawa et al. (1999), que caracterizou a enzima produzida por *Trichoderma reesei* e observou que sua massa molecular era próxima a 35 kDa.

As outras bandas proteicas presentes na canaleta da amostra proveniente da troca iônica (figura 13) podem representar outras proteínas copurificadas ou podem representar a mesma enzima com padrões de glicosilação diferentes, já que a α -arabinofuranosidase possui pelo

menos 2 sítios preditos para *O*-glicosilação (figura 14) e outros 2 sítios preditos para *N*-glicosilação (figura 15).

```
##gff-version 2
##source-version NetOGlyc 4.0.0.13
##date 22-11-22
##Type Protein
#seqname      source feature start end score strand frame comment
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 10 10 0.0373334 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 11 11 0.0707201 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 20 20 0.130296 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 21 21 0.164828 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 22 22 0.0878604 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 25 25 0.0371062 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 27 27 0.0773514 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 34 34 0.0465528 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 35 35 0.22154 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 38 38 0.0711475 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 45 45 0.234455 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 46 46 0.110275 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 47 47 0.21225 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 53 53 0.42695 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 55 55 0.0457542 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 65 65 0.33036 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 69 69 0.410785 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 70 70 0.554274 . . #POSITIVE
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 71 71 0.5 . . #POSITIVE
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 73 73 0.411523 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 76 76 0.297087 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 88 88 0.0171911 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 93 93 0.0207652 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 94 94 0.0335773 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 98 98 0.0199831 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 104 104 0.17806 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 111 111 0.474689 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 138 138 0.136706 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 150 150 0.168818 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 153 153 0.176717 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 161 161 0.451161 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 163 163 0.113496 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 165 165 0.176853 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 179 179 0.0170383 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 194 194 0.116116 . .
G1322_T1      netOGlyc-4.0.0.13 CARBOHYD 195 195 0.149659 . .
```

Figura 14: Predição de sítios de *O*-glicosilação do tipo mucina (GalNAc) presentes na sequência de aminoácidos da α -ABF da família GH54 de *T. pinophilus* feita no software NetOGlyc 4.0.

Output for 'g1322.t1'

Name: g1322.t1 Length: 507

```
MFPKIKPERTSLFALGLLASSSLVTATGPCDIYSSGGTPCVAHSTTRALYASYSYGALYQVQRGSDGATTTISPLSAGGV 80
ANAAAQDTFCANNTCLITIIYDQSGRGNHLTQAPPGGFDGPDVNGYDNLAGAIGAPVTLNGQKAYGVFISPGTGYRNAA 160
SGTATGDAAEAGMYAVLDGTHYNGQCCEFDYNAETSSTDTGNGHMEAIYYGDATYNGSGSGSPWIMADLENGLFSGESTG 240
VNSADPSLSYRFVTAVVKGEPNFHWAIRGGNAASGSLSTYYSVGRPVQVSYGYPMHKEGAILLIGGDNSNGAQTFFYEGVM 320
TSGYPTDATENSVAQANIVAAKYATTSLSGPAITVGSASISLHVTTVGYTRYIAHNGTTVNTQVSSSSSTTLKEQASWT 400
VRTGLGNSACFSFESVDTPGSYIRHYNFELLNANDGKQFYEDATFCPQSGLSGTGSLRSWSPYTRYFRHYNVNLVYAA 480
SNGGVQTFDATASFNADVTFLEVETAFA
```

..... 80
.....N..... 160
..... 240
.....N..... 320
..... 400
..... 480
..... 560

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
g1322.t1	92 NTTC	0.6926	(9/9)	++
g1322.t1	376 NGTT	0.7801	(9/9)	+++

Figura 15: Predição de sítios de *N*-glicosilação presentes na sequência de aminoácidos da α -ABF da família GH54 de *T. pinophilus* feita no software NetNGlyc 1.0 com base na presença de tripletos do tipo asparagina-x-serina/treonina.

Um estudo já demonstrou a presença de uma *O*-glicosilação na α -ABF produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* que acarretava no decréscimo de sua estabilidade em valores ácidos de pH e no aumento de sua estabilidade em valores de pH básicos e valores mais altos de temperatura, mas nenhuma diferença notável foi observada em relação à eficiência catalítica e aos valores de pH e temperatura ótimos (AMORE et al., 2015). Poucos estudos na literatura descrevem as rotas e os efeitos de glicosilações em enzimas das famílias GH envolvidas na hidrólise de biomassas lignocelulósicas (LU; YANG; LIU, 2012) e a predição de sítios de glicosilação, apesar de fornecer informações sobre as regiões disponíveis na sequência proteica para serem glicosiladas, podem levar a resultados incertos, sendo necessário análises mais confiáveis, como métodos de espectrométricos, para concluir sobre a presença ou não desses grupos.

5.5 Caracterização bioquímica

O efeito do pH na atividade e estabilidade da α -arabinofuranosidase parcialmente purificada sobre o substrato ρ NP α Ara foi avaliado (figura 16), como descrito no item 4.10.1.

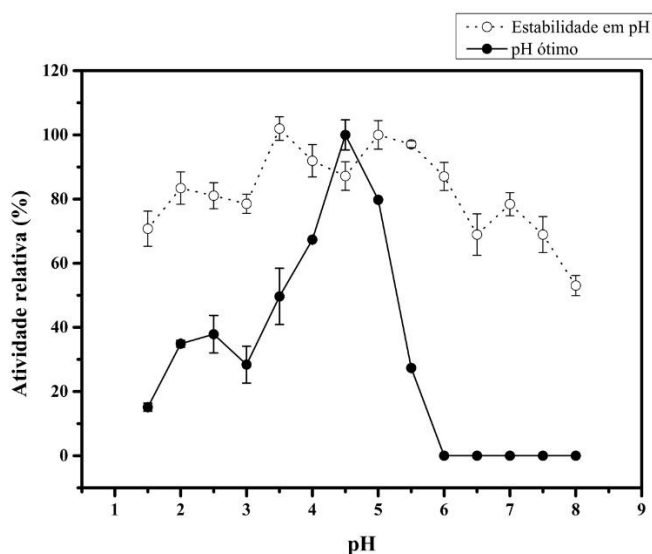


Figura 16: efeito do pH na atividade da α -ABF purificada de *T. pinophilus*. Todos os valores de desvio-padrão foram menores que 10%.

É possível observar que a enzima apresentou maior valor de atividade em pH 4,5 e manteve mais de 50% da sua atividade apenas na faixa de pH de 4 a 5, sendo ela uma enzima estritamente ácida. Embora tenha apresentado baixa atividade fora dessa faixa, a enzima demonstrou ser estável em uma ampla faixa de pH, mantendo mais de 80% da sua atividade

residual na faixa de pH de 2 a 6 e mais de 50% da sua atividade residual na faixa de pH de 1,5 a 8 quando incubada por uma hora em tampões que compreendam esses valores. Isso permite inferir que valores de pH distantes das condições preferenciais da enzima não afetam a sua estabilidade no tempo e nos valores de pH testados.

O efeito da temperatura na atividade (figura 17a) e estabilidade (figuras 17b, 17c e 17d) do α -arabinofuranosidase parcialmente purificada sobre o substrato ρ NP α Ara foi avaliado, como descrito no item 4.10.2.

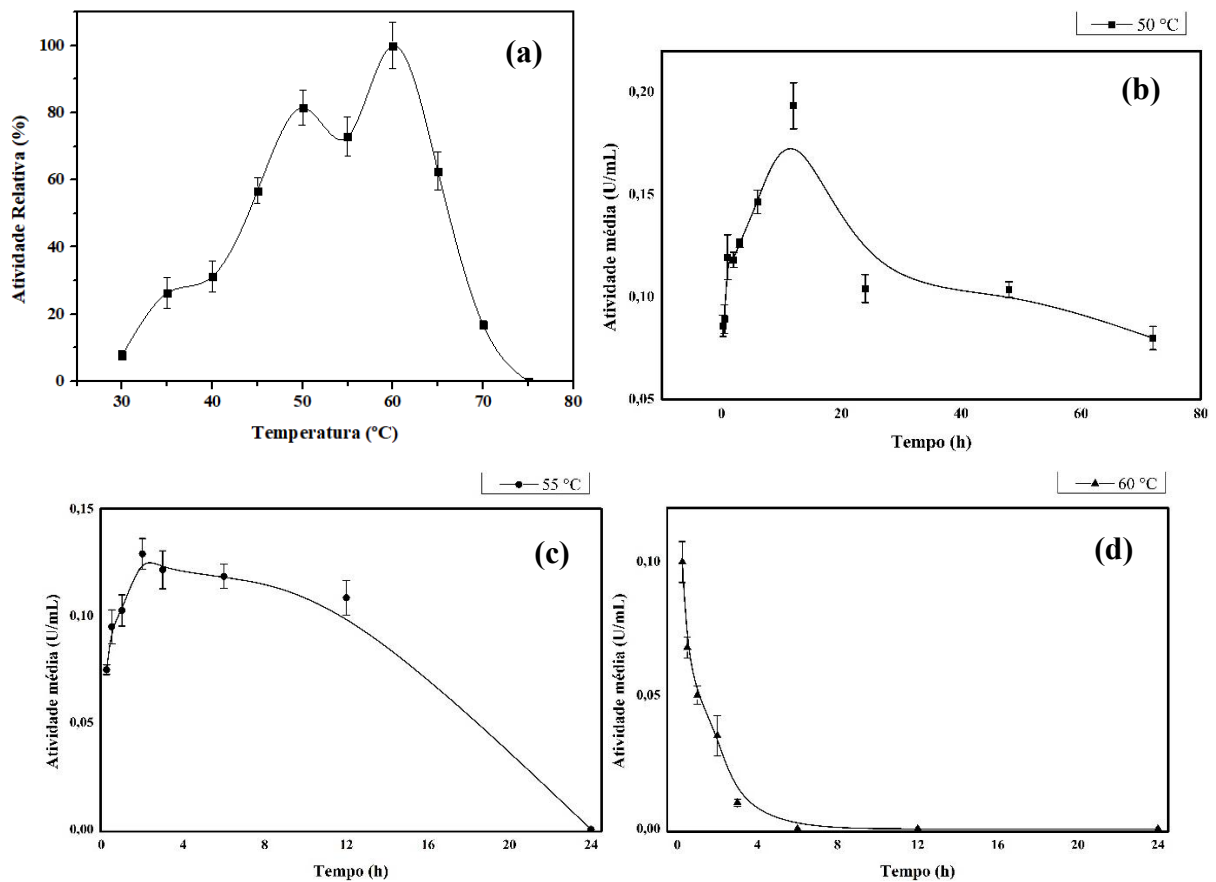


Figura 17: Efeito da temperatura na atividade (a) e na estabilidade α -ABF purificada de *T. pinophilus* a 50 (b), 55 (c) e 60 °C (d). Todos os valores de desvio-padrão foram menores que 10%.

É possível notar que a enzima exibiu maior valor de atividade a 60 °C e manteve atividade acima de 80% a 50 °C. Nas temperaturas de 45, 55 e 65 °C a enzima ainda manteve atividade acima de 50%, mas nos outros valores testados a atividade enzimática foi reduzida drasticamente. A temperatura ótima de 60 °C já foi observada em outras α -ABFs descritas na literatura, como a AbfB1 da família GH54 produzida por *Penicillium funiculosum* (GUAIS et al., 2010), AFase-H4 e AFase-E3 da família GH54, de *Chloroflexi bacterium* e *Candidatus*

Reconcillibacillus cellulovorans, respectivamente (FORTUNE et al., 2019) e ABF2 da família GH51 de *Penicillium purpurogenum* (RAVANAL; EYZAGUIRRE, 2015).

Com relação à termoestabilidade, a enzima apresentou atividade relativa superior a 80% durante 12 horas na temperatura de 50 °C e manteve atividade residual acima de 50% durante as 72 horas (figura 17b). Essa característica é desejável do ponto de vista biotecnológico, uma vez que processos industriais como a sacarificação de biomassas lignocelulósicas e o branqueamento da polpa celulósica são realizados nessa temperatura por períodos prolongados. Na temperatura de 55 °C a enzima mostrou ser estável nas 12 primeiras horas, mantendo 80% da sua atividade relativa, mas após 24h incubada, nenhuma atividade residual foi detectada. Em contrapartida, quando avaliada a 60 °C, temperatura que forneceu maior atividade enzimática no teste anterior, a enzima exibiu perda expressiva de atividade após 30 minutos incubada.

Os valores de meia vida ($t_{1/2}$) encontrados para a α -arabinofuranosidase da família GH54 de *T. pinophilus* foram estimados a partir da correlação entre os valores de atividade obtidos nos experimentos de termoestabilidade com o tempo de incubação e foram ajustados a uma equação do tipo exponencial decadente ($y = a \cdot e^{-bx}$) ou linear ($y = ax + b$), sendo escolhida aquela que mais se adequou ao gráfico observado, usando o programa OriginPro versão 9. Os valores de meia-vida encontrados para a enzima purificada incubada nas temperaturas de 50, 55 e 60 °C foram, respectivamente, 54,99h, 14,03h e 0,27h.

Também foi avaliado o efeito de íons, moduladores e agentes desnaturantes na atividade da α -arabinofuranosidase parcialmente purificada sobre o substrato pNP α Ara (figura 18), como descrito no item 4.10.3.

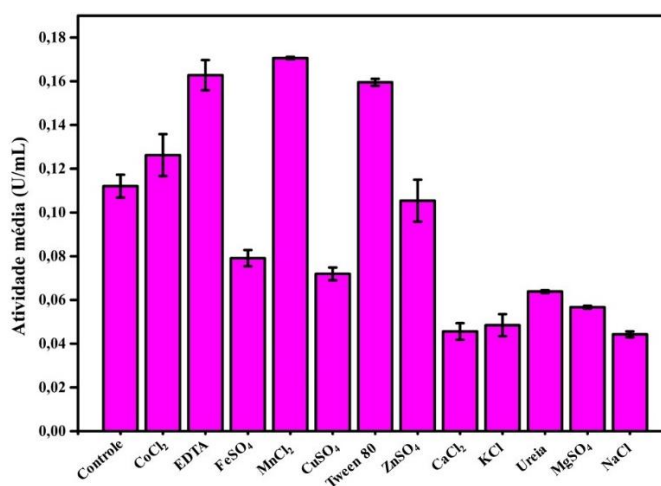


Figura 18: Efeito de íons, moduladores e agentes desnaturantes na atividade da α -ABF purificada de *T. pinophilus*. Todos os valores de desvio-padrão foram menores que 10%.

Os testes mostraram que na presença de Co^{2+} e Mn^{2+} , a enzima apresentou maior atividade de α -arabinofuranosidase que o ensaio controle (sem íons, moduladores e agentes desnaturantes). Na presença de Zn^{2+} a enzima apresentou uma perda mínima de atividade em relação ao controle e todos os outros sais metálicos levaram à diminuição da atividade enzimática.

Na presença de EDTA e Tween 80, houve um incremento de 50,7% e 14,7%, respectivamente, na atividade de α -arabinofuranosidase. O EDTA atua como agente quelante de íons metálicos, sendo descrito como inibidor de muitas enzimas que necessitam de um cofator para serem ativas. No entanto, como não foi observado nenhuma queda na atividade enzimática, pode-se inferir que não há dependência de íons metálicos na ação da α -arabinofuranosidase. E como a atividade enzimática aumentou, é possível que o EDTA tenha complexado com algum íon presente no meio que eventualmente prejudicasse a ação catalítica da enzima. Surfactantes não-iônicos, como Tween 20 e Tween 80, são utilizados para aumentar a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos, uma vez que esses facilitam a emulsão das interfaces hidrofílicas e hidrofóbicas do meio reacional, o que implica em uma maior solubilização e disponibilização do substrato para a enzima (POZDNYAKOVA; RODAKIEWICZ-NOWAK; TURKOVSKAYA, 2004), levando ao aumento na atividade enzimática.

Finalmente, foi avaliado, nas condições otimizadas do ensaio enzimático, se a α -ABF purificada exibiria atividade sobre diferentes substratos. A tabela 6 mostra o resultado desse teste, em que é possível notar que a enzima apresentou atividade somente em $\rho\text{NP}\alpha\text{Ara}$ (controle) e em $\rho\text{NP}\beta\text{Gal}$, que a enzima apresentou atividade 0,061 U/mL, correspondendo a 26,99% de atividade relativa com relação ao substrato padrão. Esse resultado mostra que a α -arabinofuranosidase da família GH54 de *T. pinophilus* possui caráter bifuncional, exibindo atividade de β -galactosidase.

Tabela 6: Teste de especificidade da enzima α -ABF de *T. pinophilus* em diferentes substratos (n.d. = não detectada).

Substrato	Atividade (U/mL)	Atividade relativa (%)
$\rho\text{NP}\alpha\text{Ara}$	$0,226 \pm 0,010$	100
$\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$	n.d.	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Gal}$	$0,061 \pm 0,003$	26,99
$\rho\text{NP}\alpha\text{Glc}$	n.d.	0

ρ NP β Glc	n.d.	0
ρ NP β Man	n.d.	0
ρ NP β Xil	n.d.	0

Não é a primeira vez que se relata uma α -arabinofuranosidase bifuncional. Motta, et al. (2021) reportaram uma α -arabinofuranosidase da família GH54 de *Trichoderma harzianum* com atividade expandida sobre o substrato β -D-galactopiranosídeo, além de possuir os domínios LTD, RICIN e NPCBM em sua estrutura terciária, que estão relacionadas com a clivagem de lactose e galactose. Ravanal, et al. (2015) estudaram as propriedades da α -arabinofuranosidase 4 da família GH54 de *Penicillium purpurogenum* e observaram que a enzima era ativa sobre o substrato β -D-galactopiranosídeo, apresentando atividade relativa de 22,25% quando comparada ao ensaio utilizando o substrato ρ NP α Ara. Um estudo sobre a caracterização de uma α -arabinofuranosidase (mais tarde classificada na família GH54) de *Trichoderma reesei* revelou que a enzima possui atividade secundária de β -xilosidase (MARGOLLES-CLARK et al., 1996). Embora o banco de dados CAZy classifique a família GH54 como um grupo que abrange enzimas com atividade de α -arabinofuranosidase e β -xilosidase, foi possível notar que algumas enzimas pertencentes a essa família são ativas sobre outros substratos, mostrando a diversidade funcional dessa família.

5.6 Efeitos da α -ABF na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

As atividades de FPAse e arabinofuranosidase foram mensuradas para o coquetel comercial Multifect[®] CL e a α -ABF purificada com o intuito de calcular o volume de enzima utilizada no experimento (tabela 7). A baixa atividade de arabinofuranosidase detectada no pool é justificada pelas condições do ensaio, que foi realizado a 50 °C e em tampão citrato de sódio, pH 5.0, portanto em condições de temperatura e pH que não fornecem a atividade máxima da enzima, conforme discutido no item 5.5. Apesar de já existir coquetéis comerciais de nova geração com maior eficiência na hidrólise de biomassas lignocelulósicas, tais como Cellic[®] CTec3 ou Spirizyme[®] da Novozymes (LOPES; FERREIRA FILHO; MOREIRA, 2018), o coquetel comercial Multifect[®] CL foi escolhido neste teste por ser uma mistura rica em celulasas e apresentar baixa atividade de hemicelulasas, além de não apresentar α -arabinofuranosidasas em sua composição (tabela 7), o que permite avaliar melhor o efeito da suplementação dessa enzima.

Tabela 7: atividade de FPase, xilanase e arabinofuranosidase no coquetel comercial Multifect® CL e no pool enzimático contendo a α -ABF purificada. Todos os valores de desvio-padrão foram menores que 10%.

Amostra/ensaio enzimático	Multifect® CL	α -ABF purificada
FPase	431,96 FPU	n.d.
Arabinofuranosidase	n.d.	0,142 U

De acordo com a figura 19a, o coquetel comercial (5 FPU/g) liberou 2,06 g/L de glicose, 0,16 g/L de xilose e 0,05 g/L de arabinose. Já nas amostras suplementadas com a α -arabinofuranosidase (5 FPU/g + 5 U/g), houve uma liberação de 3,51 g/L de glicose, 0,59 g/L de xilose e 0,18 g/L de arabinose, representando um aumento de 1,7, 3,68 e 3,6 vezes na liberação desses açúcares, respectivamente, se comparada ao desempenho do coquetel comercial sem a presença da α -ABF. Essa diferença estatisticamente significativa na liberação desses açúcares permite afirmar que a α -arabinofuranosidase da família GH54 de *T. pinophilus* exerce um papel importante na hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar por atuar tanto na liberação de arabinose da hemicelulose, como também por tornar a celulose mais disponível à ação das celulases. Além disso, sua atividade secundária de β -galactosidase pode contribuir no processo de despolimerização da hemicelulose, o que aumenta ainda mais a sua eficiência como enzima acessória.

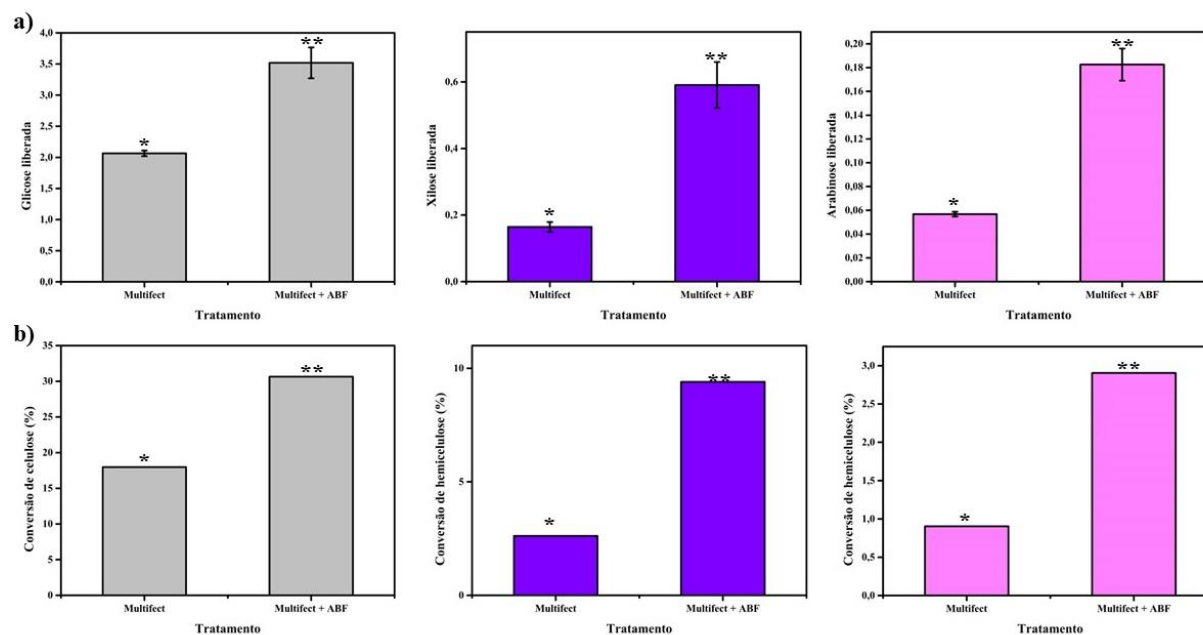


Figura 19: Efeito da suplementação do coquetel enzimático Multifect® CL com a α -arabinofuranosidase na produção de glicose, xilose e arabinose em g/L (a) e na conversão de

celulose e hemicelulose em seus açúcares monoméricos (b). As barras em cinza representam glicose, em roxo representam xilose e em rosa representam arabinose. Símbolos diferentes acima das barras representam diferença estatística significativa na análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey com nível de significância de 5%.

A composição do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino, usado neste experimento, está apresentada na tabela 8. Esse tipo de pré-tratamento foi escolhido por não afetar a fração de hemicelulose na biomassa, permitindo avaliar a atuação da enzima purificada quando suplementada ao coquetel comercial. A partir dos teores relativos de celulose e hemicelulose no material pré-tratado, foi possível calcular a taxa de conversão de celulose em glicose e de hemicelulose em xilose e arabinose, possibilitando avaliar de outra forma a eficiência da suplementação do coquetel comercial com a α -arabinofuranosidase.

Conforme a figura 19b, a ação do coquetel comercial não suplementado resultou em uma conversão de 17,97% da celulose em glicose e 3,51% de conversão da hemicelulose, sendo 2,61% em xilose e 0,9% em arabinose. Por outro lado, na amostra suplementada com a α -ABF purificada, houve a conversão de 30,63% de celulose em glicose e 12,30% de conversão da hemicelulose, sendo 9,40% em xilose e 2,90% em arabinose, mostrando mais uma vez a eficiência da α -arabinofuranosidase da família GH54 de *T. pinophilus* no aumento da taxa de hidrólise dos polissacarídeos estruturais do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado.

Tabela 8: composição do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino com NaOH 1,5% durante 30 minutos.

Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado		
Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
57,42 ± 3,06	31,41 ± 1,94	7,86 ± 0,065

O efeito da suplementação de coquetéis enzimáticos com arabinofuranosidasas para aumentar a taxa de conversão de celulose em glicose é tratado com controvérsia na literatura. Em um estudo que avaliava o efeito da adição de α -ABF e endoxilase a um coquetel enzimático rico em celulases, Alvira, Negro & Ballesteros (2011) observaram um aumento de 19,5% e 18,6% na liberação de glicose e xilose, respectivamente, a partir da sacarificação da palha de trigo pré-tratada por 72 horas. Em contrapartida, Selig et al. (2015) mostraram que o tratamento enzimático da arabinoxilana de trigo com uma α -ABF da família GH51 para a remoção dos resíduos de α -1,3-arabinofuranosídeo reduziu a hidrólise da celulose em

aproximadamente 50%. Já foi observado que xilo-oligômeros não substituídos podem ocupar o sítio ativo Cel7A de celobiohidrolases, impedindo que as fibras de celulose se movam no centro catalítico dessas enzimas, levando à inibição de sua atividade (XIN et al., 2019). Por isso, deve-se avaliar com cautela a quantidade de α -ABF adicionada na sacarificação de biomassas lignocelulósicas para não promover um efeito inibitório. O ideal é que as arabinofuranosidases disponíveis no meio reacional sejam suficientes para remover os resíduos de arabinofuranosídeos, reduzindo o efeito de impedimento estérico de xilanases às cadeias principais de xilana, contudo, sem que ocorra uma remoção excessiva desses grupos de forma que a xilana não substituída passe a inibir a ação das celulasas presentes no meio. No presente estudo foi possível observar que a adição de 5 U de α -ABF por grama de biomassa pré-tratada foi capaz de aumentar satisfatoriamente a liberação de glicose, xilose e arabinose, bem como aumentar a conversão de celulose e hemicelulose em seus açúcares monoméricos.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Este foi o primeiro trabalho a avaliar o secretoma experimental do fungo *Talaromyces pinophilus* cultivado em casca de soja sob fermentação submersa. Nessas condições, *T. pinophilus* foi capaz de secretar 419 proteínas, sendo 137 delas identificadas como ativas em carboidratos, sendo esse número e variedade superior ao secretado por fungos descritos como bons produtores de enzimas lignocelulolíticas para aplicação biotecnológica.
- A predição das CAZymes potencialmente secretadas com base no genoma de *T. pinophilus* revelou a capacidade deste fungo de secretar 451 enzimas distribuídas nas famílias de glicosil hidrolases, carboidrato esterases, polissacarídeo liases e enzimas de ação auxiliar. A diversidade encontrada na análise de predição, sobretudo da classe de glicosil hidrolases, ressalta o potencial de *T. pinophilus* ser explorado como fonte de enzimas para a sacarificação de biomassas lignocelulósicas. O método computacional usado nesta predição mostrou-se eficiente ao encontrar resultados que condizem com a literatura, podendo ser usado para outros organismos.
- A α -arabinofuranosidase da família GH54 de *T. pinophilus* pode ser parcialmente purificada com duas etapas simples de purificação, mantendo atividade específica de 18,84 U/mg, um fator de purificação de 7,24 e rendimento de 6,08%. Sua massa

molecular estimada de 52 kDa, em concordância com o que foi predito com base em sua sequência de aminoácidos.

- A α -arabinofuranosidase da família GH54 de *T. pinophilus* foi caracterizada bioquimicamente, apresentando maior atividade em pH 4,5 e a 60 °C. A enzima demonstrou ser estável em pH 2 a 6, mantendo atividade relativa superior a 80% e manteve atividade relativa superior a 50% durante 72 horas a 50 °C. Além disso, a enzima demonstrou ser modulada positivamente na presença de Co^{2+} , Mn^{2+} , EDTA e Tween 80. Por fim, além de exibir atividade de arabinofuranosidase, a enzima também atua sobre o substrato $\rho\text{NP-}\beta$ -galactopiranosídeo.
- A adição de 5 U/g de α -arabinofuranosidase a 5 FPU/g do coquetel enzimático Multifect[®] CL na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino aumentou a taxa de hidrólise de celulose em 12,63% e a taxa de hidrólise da hemicelulose em xilose e arabinose em 6,79% e 2%, respectivamente. A liberação de glicose, xilose e arabinose no coquetel suplementado foi 1,7, 3,68 e 3,6 maior quando comparado ao coquetel não suplementado, mostrando que a adição da α -arabinofuranosidase promove efeito positivo na sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHIM, I. R.; ABO-ELYOUSR, K. A. M. *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. **Microbiological Research**, vol. 212–213, p. 1–9, 1 Jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.004>.

AGRAWAL, G. K.; JWA, N. S.; LEBRUN, M. H.; JOB, D.; RAKWAL, R. Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. **Proteomics**, vol. 10, no. 4, p. 799–827, Feb. 2010. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900514>.

AL-MARDEAI, S. et al. Membrane Bioreactors: A Promising Approach to Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Catalysts MDPI**, 1 out. 2022.

ALVIRA, P.; NEGRO, M. J.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -L-

arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresource Technology**, vol. 102, no. 6, p. 4552–4558, Mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.112>.

AMORE, A. et al. Analysis of the role of O-glycosylation in GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 6, p. 727–737, 1 nov. 2015.

ANH, P. T.; NGAN, P. K.; TO, K. A. EFFICIENT STARCH RECOVERY FROM CASSAVA BAGASSE: ROLE OF CELLULASE AND PECTINASE. **Vietnam Journal of Science and Technology**, vol. 57, no. 4, p. 401, 1 Jul. 2019. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/57/4/12764>.

ARMENDÁRIZ-RUIZ, M. et al. Carbohydrate esterases: An overview. **Methods in Molecular Biology**. Humana Press Inc., 2018. v. 1835p. 39–68.

ASMARANI, O.; FANANI, M. Z.; PUSPANINGSIH, N. N. T. Biochemical Potential of α -L-Arabinofuranosidase as Anti-Tuberculosis Candidate. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 82–89, 2016.

ASHBURNER, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology The Gene Ontology Consortium. **Nature Genetics**, vol. 25, p.25–29 (2000).

ASINA, F. N. U.; BRZONOVA, I.; KOZLIAK, E.; KUBÁTOVÁ, A.; JI, Y. Microbial treatment of industrial lignin: Successes, problems and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 77, p. 1179–1205, 2017. doi:10.1016/j.rser.2017.03.098.

BAI, H. et al. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, 101, p. 408-486, 2006.

BARBIERI, G. S. et al. Xylanase Production by *Talaromyces amestolkiae* Valuing Agroindustrial Byproducts. **BioTech**, v. 11, n. 2, 1 jun. 2022.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 8, 1992.

BERLIN, A. et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287–296, 1 jun. 2007.

BIBI, Marya; ASHRAF, G.; OMER IQBAL, M.; RAFIQ, M.; YUSRA NAZEER, H. Review on Cellular, Molecular and Industrial level Role of Microbial Enzymes. **Scholars Bulletin**, vol. 7, no. 4, p. 87–92, 13 Apr. 2021. <https://doi.org/10.36348/sb.2021.v07i04.004>.

BINOD, P.; PAPAMICHAEL, E.; VARJANI, S.; SINDHU, R. Introduction to Green Bioprocesses: Industrial Enzymes for Food Applications. **Energy, Environment, and Sustainability**, p. 1-8, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_1.

BOJA, E. S.; KINSINGER, C. R.; RODRIGUEZ, H.; SRINIVAS, P. Integration of omics sciences to advance biology and medicine. **Clinical Proteomics**. BioMed Central Ltd., vol. 11, 15 Dec. 2014. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-45>.

BORIN, G. P.; SANCHEZ, C. C.; DE SOUZA, A. P.; DE SANTANA, E. S.; DE SOUZA, A. T.; LEME, A. F. P.; SQUINA, F. M.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G. H.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 6, 8 Jun. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129275>.

BOURAOUI, H.; DESROUSSEAUX, M. L.; IOANNOU, E.; ALVIRA, P.; MANAĪ, M.; RÉMOND, C.; DUMON, C.; FERNANDEZ-FUENTES, N.; O'DONOHUE, M. J. The GH51 α -l-arabinofuranosidase from *Paenibacillus* sp. THS1 is multifunctional, hydrolyzing main-chain and side-chain glycosidic bonds in heteroxylans. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 9, no. 1, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0550-x>.

BRAAKSMA, M.; MARTENS-UZUNOVA, E. S.; PUNT, P. J.; SCHAAP, P. J. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. **BMC Genomics**, vol. 11, no. 1, 19 Oct. 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-584>.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**. May 7; vol.72, no. 2, p. 48-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

BRADSTREET, R.B. Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. **The Bradstreet Laboratories, Inc.**, 1356 North Broad St., Hillside, N. 1.

BUSK, P. K.; PILGAARD, B.; LEZYK, M. J.; MEYER, A. S.; LANGE, L. Homology to peptide pattern for annotation of carbohydrate-active enzymes and prediction of function. **BMC Bioinformatics**, vol. 18, no. 1, 12 Apr. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1625-9>.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; DE SCHEER, A. P. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polimeros**, vol. 22, no. 2, p. 149–157, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000024>.

CARVALLO, M. et al. Characterization of an α -L-arabinofuranosidase gene (abf1) from *Penicillium purpurogenum* and its expression. **Mycological Research**, v. 107, n. 4, p. 388–394, 1 abr. 2003.

CONTESINI, F. J.; FIGUEIRA, J. de A.; KAWAGUTI, H. Y.; FERNANDES, P. C. de B.; CARVALHO, P. de O.; NASCIMENTO, M. da G.; SATO, H. H. Potential applications of carbohydrases immobilization in the food industry. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 14, no. 1, p. 1335–1369, Jan. 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms14011335>.

CONTESINI, F. J.; FRANDBSEN, R. J. N.; DAMASIO, A. Editorial: CAZymes in Biorefinery: From Genes to Application. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, vol. 9, 10 Feb. 2021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.622817>.

CONTESINI, F. J.; LIBERATO, M. V.; RUBIO, M. V.; CALZADO, F.; ZUBIETA, M. P.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; SQUINA, F. M.; BRACHT, F.; SKAF, M. S.; DAMASIO, A. R. Structural and functional characterization of a highly secreted α -L-arabinofuranosidase (GH62) from *Aspergillus nidulans* grown on sugarcane bagasse. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, vol. 1865, no. 12, p. 1758–1769, 1 Dec. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.09.001>.

CORRÊA, C. L.; MIDORIKAWA, G. E. O.; FILHO, E. X. F.; NORONHA, E. F.; ALVES, G. S. C.; TOGAWA, R. C.; SILVA-JUNIOR, O. B.; COSTA, M. M. do C.; GRYNBERG, P.; MILLER, R. N. G. Transcriptome Profiling-Based Analysis of Carbohydrate-Active Enzymes in *Aspergillus terreus* Involved in Plant Biomass Degradation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, vol. 8, 6 Oct. 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.564527>.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–1372, dez. 2008.

CRAGG, S. M.; BECKHAM, G. T.; BRUCE, N. C.; BUGG, T. D. H.; DISTEL, D. L.; DUPREE, P.; ETXABE, A. G.; GOODELL, B. S.; JELLISON, J.; MCGEEHAN, J. E.; MCQUEEN-MASON, S. J.; SCHNORR, K.; WALTON, P. H.; WATTS, J. E. M.; ZIMMER, M. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current Opinion in**

Chemical Biology, vol. 29, p. 108–119, 1 Dec. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018>.

DAS, S.; ORENGO, C. A. Protein function annotation using protein domain family resources. **Methods**, vol. 93, p. 24–34, 15 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.029>.

DE ANDRADE, L. G. A. et al. Sugarcane bagasse saccharification by purified β -glucosidases from *Chrysosporthe cubensis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 199–205, 1 out. 2017.

DE GOUVÊA, P. F. et al. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 3 abr. 2018.

DHAKAR, K.; JAIN, R.; TAMTA, S.; PANDEY, A. Prolonged laccase production by a cold and pH tolerant strain of *penicillium pinophilum* (MCC 1049) isolated from a low temperature environment. **Enzyme Research**, vol. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/120708>.

DRULA, E.; GARRON, M. L.; DOGAN, S.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B.; TERRAPON, N. The carbohydrate-active enzyme database: Functions and literature. **Nucleic Acids Research**, vol. 50, no. D1, p. D571–D577, 7 Jan. 2022. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>.

FILIATRAULT-CHASTEL, C.; HEISS-BLANQUET, S.; MARGEOT, A.; BERRIN, J. G. From fungal secretomes to enzymes cocktails: The path forward to bioeconomy. **Biotechnology Advances**, vol. 52, 15 Nov. 2021. doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107833.

FAN, X. M. et al. The structures and applications of microbial chondroitin AC lyase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 38, 199, 1 nov. 2022.

FLIPPPI, M. J. A. et al. Cloning and characterization of the *abfB* gene coding for the major Ot-L-arabinofuranosidase (ABF B) of *Aspergillus niger*. **Current Genetics**, vol. 24, p.525-532 dez. 1993. doi: 10.1007/BF00351717..

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 90, p. 53–60, 1 Aug. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.011>.

FORTUNE, B. et al. Characterisation of three novel α -L-arabinofuranosidases from a compost metagenome. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, 18 abr. 2019.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 1993. DOI: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x

GAUNA, A. et al. Secretome characterization of the lignocellulose-degrading fungi *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma applanatum*. **Mycologia**, vol. 113, ed. 5, p. 870-890, 2021.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, vol. 59, n. 2, p. 257-268, 1987. Doi: 10.1351/pac198759020257

GIRARD, V.; DIERYCKX, C.; JOB, C.; JOB, D. Secretomes: The fungal strike force. **Proteomics**, vol. 13, no. 3–4, p. 597–608, Feb. 2013. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200282>.

GOGLEVA, A.; DROST, H. G.; SCHORNACK, S. SecretSanta: Flexible pipelines for functional secretome prediction. 34., 1 Jul. 2018. **Bioinformatics** Oxford University Press, 1 Jul. 2018. vol. 34, p. 2295–2296. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty088>.

GRANJA-TRAVEZ, R. S. et al. Structural and functional characterisation of multi-copper oxidase CueO from lignin-degrading bacterium *Ochrobactrum* sp. reveal its activity towards lignin model compounds and lignosulfonate. **FEBS Journal**, v. 285, n. 9, p. 1684–1700, 1 maio 2018.

GRUNO, M. et al. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 503–511, 5 jun. 2004.

GUAIS, O.; TOURRASSE, O.; DOURDOIGNE, M.; PARROU, J. L.; FRANCOIS, J. M. Characterization of the family GH54 α -L-arabinofuranosidases in *Penicillium funiculosum*, including a novel protein bearing a cellulose-binding domain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 87, no. 3, p. 1007–1021, Jul. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2532-4>.

HAILE, S.; AYELE, A. Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. **The Scientific World Journal**, vol. 2022, p. 1–15, 11 Mar. 2022. DOI 10.1155/2022/1881305. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2022/1881305/>.

HAQUE, M. E.; PARVIN, M. S. Retracted : First report of *Talaromyces pinophilus* causing postharvest rot of sugar beet (*Beta vulgaris*) in Minnesota, USA . **New Disease Reports**, vol. 42, no. 1, p. 15–15, Jul. 2020. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.042.015>.

Hepperle D. 2004. SeqAssem - analysis and contig assembly of sequences. **SequentiX-Digital DNA Processing**, Klein Raden, Germany.

HOUFANI, A. A. et al. **Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review. Biomass and Bioenergy** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2020.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, vol. 6, no. 25, p. 4497–4559, 7 Jul. 2015. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, vol. 40, no. 9, p. 2931–2944, Sep. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>.

JUN, H.; KIESELBACH, T.; JÖNSSON, L. J. Enzyme production by filamentous fungi: Analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. **Microbial Cell Factories**, vol. 10, 23 Aug. 2011. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-68>.

KUBICEK, C. P.; STARR, T. L.; GLASS, N. L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, vol. 52, p. 427–451, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>.

KUBICEK, C. Production of Cellulase and Hemicellulase by Fungi. **Fungi and Lignocellulosic Biomass**, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118414514.ch9>

KNUTSEN, J. S.; DAVIS, R. H. Cellulase Retention and Sugar Removal by Membrane Ultrafiltration During Lignocellulosic Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. vol. 113-116, p. 585-599, 2004.

KUMAR, D.; BHARDWAJ, R.; JASSAL, S.; GOYAL, T.; KHULLAR, A.; GUPTA, N. Application of enzymes for an eco-friendly approach to textile processing. **Environmental Science and Pollution Research**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16764-4>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAGAERT, S. et al. β -Xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylyan degradation. *Biotechnology Advances*. **Elsevier Inc.**, 2014.

LEE, D. S.; WI, S. G.; LEE, Y. G.; CHO, E. J.; CHUNG, B. Y.; BAE, H. J. Characterization of a new α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium* sp. LYG 0704, and their application in lignocelluloses degradation. **Molecular Biotechnology**, vol. 49, no. 3, p. 229–239, Nov. 2011. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9396-4>.

LI, C. X.; ZHAO, S.; ZHANG, T.; XIAN, L.; LIAO, L. S.; LIU, J. L.; FENG, J. X. Genome sequencing and analysis of *Talaromyces pinophilus* provide insights into biotechnological applications. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 1, 1 Dec. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00567-0>.

LOUISE GLASS, N.; SCHMOLL, M.; CATE, J. H. D.; CORADETTI, S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual Review of Microbiology**, vol. 67, p. 477–498, Sep. 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>.

LIU, H.-M.; LI, H.-Y. Application and Conversion of Soybean Hulls. **Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity**, 2017. DOI: 10.5772/66744

LOPES, A. M.; FERREIRA FILHO, E. X.; MOREIRA, L. R. S. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. **Journal of Applied Microbiology** Blackwell Publishing Ltd, 1 set. 2018.

LU, D.; YANG, C.; LIU, Z. How hydrophobicity and the glycosylation site of glycans affect protein folding and stability: A molecular dynamics simulation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 1, p. 390–400, 12 jan. 2012.

LU, Y.; LU, Y. C.; HU, H. Q.; XIE, F. J.; WEI, X. Y.; FAN, X. Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. **Journal of Spectroscopy**, vol. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8951658>.

LUCIA, L.; AYOUB, A. Polysaccharide-based Fibers and Composites. **Chemical and Engineering Fundamentals and Industrial Applications**, ed. 1. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56596-5>

MA, Y.; SUN, S.; HAO, H.; XU, C. Production, purification and characterization of an exopolysaccharide from *Penicillium janthinellum* sw09. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, vol. 88, p. 479–487, 1 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150051>.

MAITY, A.; PAL, R. K.; CHANDRA, R.; SINGH, N. V. *Penicillium pinophilum*-A novel microorganism for nutrient management in pomegranate (*Punica granatum* L.). **Scientia Horticulturae**, vol. 169, p. 111–117, 16 Apr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.02.001>.

MÄKELÄ, M. R.; DONOFRIO, N.; DE VRIES, R. P. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, vol. 72, p. 2–9, 1 Nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.010>.

MALGAS, S. et al. Unraveling synergism between various GH family xylanases and debranching enzymes during hetero-xylan degradation. **Molecules**, v. 26, n. 22, 1 nov. 2021.

MARGOLLES-CLARK, E. et al. Cloning of Genes Encoding-L-Arabinofuranosidase and-Xylosidase from *Trichoderma reesei* by Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996. DOI: 10.1128/aem.62.10.3840-3846.1996

MATHEW, A.; ELDO, A. N.; MOLLY, A. G. Optimization of culture conditions for the production of thermostable polygalacturonase by *Penicillium* SPC-F 20. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 35, no. 9, p. 1001–1005, Sep. 2008. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0375-0>.

MÉNDEZ-LÍTER, J. A. et al. Production of a β -glucosidase-rich cocktail from *Talaromyces amestolkiae* using raw glycerol: Its role for lignocellulose waste valorization. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, 2021.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, p. 426–428, 1959.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 11, no. 3, p. 266–277, Jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>.

MOREAU, C. et al. Lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, 24 jun. 2019.

MORGAN, T. et al. *Penicillium Ochrochloron* RLS11 Secretome Containing Carbohydrate-Active Enzymes Improves Commercial Enzyme Mixtures During Sugarcane Straw Saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, p. 2946–2967, 2022.

MOROZOVA, O. V. et al. “Blue” laccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136–1150, 2007.

MOTTA, M. L. L. et al. A novel fungal metal-dependent α -l-arabinofuranosidase of family 54 glycoside hydrolase shows expanded substrate specificity. **Scientific Reports**, vol. 11, no. 1, 1 Dec. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90490-2>.

NGUYEN, N. A.; BARNES, S. H.; BOWLAND, C. C.; MEEK, K. M.; LITTRELL, K. C.; KEUM, J. K.; NASKAR, A. K. **A path for lignin valorization via additive manufacturing of high-performance sustainable composites with enhanced 3D printability**. 2018. Available at: <https://www.science.org>.

NGUYEN, N. A.; BOWLAND, C. C.; NASKAR, A. K. A general method to improve 3D-printability and inter-layer adhesion in lignin-based composites. **Applied Materials Today**, vol. 12, p. 138–152, 1 Sep. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.03.009>.

NOGAWA, M. et al. An-L-Arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* Containing a Noncatalytic Xylan-Binding Domain. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 65, ed. 9, p. 3964-3968.

NUMAN, M. T.; BHOSLE, N. B. α -L-arabinofuranosidases: The potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 33, no. 4, p. 247–260, Apr. 2006a. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0072-1>.

O'BRIEN, H. E. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, set. 2005.

ORENCIO-TREJO, M. et al. Cellulase and Xylanase Production by the Mexican Strain *Talaromyces stollii* LV186 and Its Application in the Saccharification of Pretreated Corn and Sorghum Stover. **Bioenergy Research**, v. 9, n. 4, p. 1034–1045, 1 dez. 2016.

PARAMESWARAN, B.; VARJANI, S.; RAVEENDRAN, S. Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing. **Chemistry and Materials Science, Chemistry and Material Science**, ed. 1, 2018.

PATEL, H.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; SHAH, A. Improved yield of α -L-arabinofuranosidase by newly isolated *Aspergillus niger* ADH-11 and synergistic effect of crude enzyme on saccharification of maize stover. **Bioresources and Bioprocessing**, vol. 2, no. 1, 1 Dec. 2015. <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0039-7>.

PATIL, N. P.; PATIL, K. P.; CHAUDHARI, B. L.; CHINCHOLKAR, S. B. Production, Purification of Exo-Polygalacturonase from Soil Isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and

Its Application. **Indian Journal of Microbiology**, vol. 52, no. 2, p. 240–246, Jun. 2012. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0162-x>.

PEREZ, E. E.; FERNÁNDEZ, M. B.; NOLASCO, S. M.; CRAPISTE, G. H. Effect of pectinase on the oil solvent extraction from different genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Journal of Food Engineering**, vol. 117, no. 3, p. 393–398, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.006>.

PINHEIRO, V. E. et al. Neosartorya glabra polygalacturonase produced from fruit peels as inducers has the potential for application in passion fruit and apple juices. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 20, 2017. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.16316>.

PORIA, V.; SAINI, J. K.; SINGH, S.; NAIN, L.; KUHAD, R. C. Arabinofuranosidases: Characteristics, microbial production, and potential in waste valorization and industrial applications. **Bioresource Technology**, vol. 304, 1 May 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123019>.

POZDNYAKOVA, N. N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O. V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 1, p. 19–24, 5 jul. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R a language and environment for statistical computing: reference index. **R Foundation for Statistical Computing**, 2010.

RADHA, A.; SNEHA, R.; KIRUTHIGA, R.; PRIYADHARSHINI, P.; PRABHU, N. A Review on Production of Polygalacturonase Using Various Organisms and Its Applications. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, , p. 1–12, 30 Oct. 2019. <https://doi.org/10.9734/ajb2t/2019/v5i330063>.

RAJESH BANU, J. et al. *Marsilea* spp.—A novel source of lignocellulosic biomass: Effect of solubilized lignin on anaerobic biodegradability and cost of energy products. **Bioresource Technology**, vol. 255, p. 220–228, 1 May 2018. doi:/10.1016/j.biortech.2018.01.103.

RAVANAL, M. C.; EYZAGUIRRE, J. Heterologous expression and characterization of α -l-arabinofuranosidase 4 from *Penicillium purpurogenum* and comparison with the other isoenzymes produced by the fungus. **Fungal Biology**, vol. 119, no. 7, p. 641–647, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.04.001>.

RAVEENDRAN, S. et al. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food**

Technology and Biotechnology, vol. 56, no. 1, p. 16–30, 2018. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.

REBELLO, S.; ANJU, M.; ANEESH, E. M.; SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, vol. 16, no. 3, p. 381–394, 1 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9437-y>.

SAKAMOTO, T.; INUI, M.; YASUI, K.; HOSOKAWA, S.; IHARA, H. Substrate specificity and gene expression of two *Penicillium chrysogenum* α -l-arabinofuranosidases (AFQ1 and AFS1) belonging to glycoside hydrolase families 51 and 54. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 97, no. 3, p. 1121–1130, Feb. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3978-3>.

SALEH, A. A. et al. Effects of dietary xylanase and arabinofuranosidase combination on the growth performance, lipid peroxidation, blood constituents, and immune response of broilers fed low-energy diets. **Animals**, v. 9, n. 7, 1 jul. 2019.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, vol. 70, p. 159–183, 15 Nov. 2011. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.04>.

SANTOS, V. T. de O.; SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops and Products**, vol. 111, p. 722–730, 1 Jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.053>.

SCHNEIDER, W. D. H. et al. *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 9, no. 1, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0476-3>.

SELIG, M. J. et al. Debranching of soluble wheat arabinoxylan dramatically enhances recalcitrant binding to cellulose. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 3, p. 633–641, 1 mar. 2015.

SERI, K. et al. L-Arabinose Selectively Inhibits Intestinal Sucrase in an Uncompetitive Manner and Suppresses Glycemic Response After Sucrose Ingestion in Animals. **Metabolism**, 1996. doi: 10.1016/s0026-0495(96)90117-1.

SINGH JADAUN, J. Pectinase: A Useful Tool in Fruit Processing Industries. **Nutrition &**

Food Science International Journal, vol. 5, no. 5, 7 Mar. 2018.
<https://doi.org/10.19080/nfsij.2018.05.555673>.

SINGH, O. V.; CHANDEL, A. K. Sustainable biotechnology-enzymatic resources of renewable energy. **Springer Cham**, ed. 1, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6>.

SINGHVI, M. S.; DIGAMBAR, & GOKHALE, V. Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10212-7>.

SIQUEIRA, G.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 10, no. 1, 11 Jul. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0860-7>.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). **National Renewable Energy Laboratory**, 2008. Available at: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.

SPATAFORA, J. W.; AIME, M. C.; GRIGORIEV, I. V.; MARTIN, F.; STAJICH, J. E.; BLACKWELL, M. The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. **Microbiology Spectrum**, vol. 5, no. 5, 22 Sep. 2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0053-2016>.

SPRINGER-VERLAG, et al. Characterization and delignification activity of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, vol. 40, p. 57-62, 1993.

STANKE, M.; MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: A web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, jul. 2005.

STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **EMBO Journal**, v. 32, n. 10, p. 1478–1488, 15 maio 2013.

STEWART, D. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. **Industrial Crops and Products**, vol. 27, no. 2, p. 202–207, Mar. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.07.008>.

SUDEEP, K. C. et al. Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. **Fermentation**, vol. 6, no. 2, 9 Jun. 2020.

<https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6020059>.

SUN, J.; LU, J.; XIE, G. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* CICC41495 for degradation of arabinoxylan in malted barley. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 124, no. 4, p. 352–358, 1 Oct. 2018. <https://doi.org/10.1002/jib.505>.

SÜTZL, L. et al. The GMC superfamily of oxidoreductases revisited: Analysis and evolution of fungal GMC oxidoreductases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, 10 maio 2019.

TAVARES, M. P.; MORGAN, T.; GOMES, R. F.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; CASTRO-BORGES, W.; DE REZENDE, S. T.; DE OLIVEIRA MENDES, T. A.; GUIMARÃES, V. M. Secretomic insight into the biomass hydrolysis potential of the phytopathogenic fungus *Chrysosporthe cubensis*. **Journal of Proteomics**, vol. 236, 30 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104121>.

THOMAS, B.; RAJ, M. C.; ATHIRA, B. K.; RUBIYAH, H. M.; JOY, J.; MOORES, A.; DRISKO, G. L.; SANCHEZ, C. Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications. **Chemical Reviews**, vol. 118, no. 24, p. 11575–11625, 26 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00627>.

TJALSMA, H.; BOLHUIS, A.; JONGBLOED, J. D. H.; BRON, S.; VAN DIJL, J. M. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 64, no. 3, p. 515–547, Sep. 2000. <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.3.515-547.2000>.

TOPAKAS, E. & PAUL, C. Microbial xylanolytic carbohydrate esterases. In: Polaina J (ed) **Industrial enzymes: structure, function and applications**. Springer Netherlands, Dordrecht, 2007. <https://doi.org/10.1042/EBC20220129>

TOUSHIK, S. H.; LEE, K. T.; LEE, J. S.; KIM, K. S. Functional Applications of Lignocellulolytic Enzymes in the Fruit and Vegetable Processing Industries. **Journal of Food Science**, vol. 82, no. 3, p. 585–593, 1 Mar. 2017. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13636>.

TSUJIBO, H.; TAKADA, C.; WAKAMATSU, Y.; KOSAKA, M.; TSUJI, A.; MIYAMOTO, K.; INAMORI, Y. Cloning and Expression of an α -L-Arabinofuranosidase Gene (stxIV) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, and characterization of the enzyme. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, vol. 66, no. 2, p. 434–438, 2002. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.434>.

UPTON, B. M.; KASKO, A. M. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: Review and perspective. **Chemical Reviews**, vol. 116, no. 4, p. 2275–2306, 14 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00345>.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. **Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, set. 2011.

VASIĆ, K.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. **Molecules**, vol. 26, no. 3, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26030753>.

VILLA-RIVERA, M. G.; CANO-CAMACHO, H.; LÓPEZ-ROMERO, E.; ZAVALA-PÁRAMO, M. G. The Role of Arabinogalactan Type II Degradation in Plant-Microbe Interactions. **Frontiers in Microbiology**, vol. 12, 25 Aug. 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730543>.

VISSER, E. M.; FALKOSKI, D. L.; DE ALMEIDA, M. N.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; GUIMARÃES, V. M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, vol. 144, p. 587–594, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.015>.

VIVEK-ANANTH, R. P.; MOHANRAJ, K.; VANDANASHREE, M.; JHINGRAN, A.; CRAIG, J. P.; SAMAL, A. Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, 1 Dec. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25016-4>.

VUONG, T. V. et al. Xylo- and cello-oligosaccharide oxidation by gluco-oligosaccharide oxidase from *Sarocladium strictum* and variants with reduced substrate inhibition. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.

WANG, F.; OUYANG, D.; ZHOU, Z.; PAGE, S. J.; LIU, D.; ZHAO, X. Lignocellulosic biomass as sustainable feedstock and materials for power generation and energy storage. **Journal of Energy Chemistry**, vol. 57, p. 247–280, 1 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2020.08.060>.

WANG, J. et al. Efficient saccharification of agave biomass using *Aspergillus niger* produced low-cost enzyme cocktail with hyperactive pectinase activity. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 26–33, 1 jan. 2019.

WATSON, J. D.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Predicting protein function from sequence and structural data. **Current Opinion in Structural Biology**, vol. 15, no. 3 SPEC. ISS., p. 275–284, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.04.003>.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, vol. 13, no. 1, p. 19–50, 1 Dec. 1996. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>.

XIN, D. et al. Insight into the role of α -arabinofuranosidase in biomass hydrolysis: Cellulose digestibility and inhibition by xylooligomers. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, 22 mar. 2019.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, vol. 44, no. 1, p. 1–10, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.012>.

YANG, Y.; YU, Y.; LIANG, Y.; ANDERSON, C. T.; CAO, J. A profusion of molecular scissors for pectins: classification, expression, and functions of plant polygalacturonases. **Frontiers in Plant Science**, vol. 9, 14 Aug. 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01208>.

YU, O.; KIM, K. H. Lignin to materials: A focused review on recent novel lignin applications. **Applied Sciences (Switzerland)**, vol. 10, no. 13, 1 Jul. 2020. <https://doi.org/10.3390/app10134626>.

ZENG, Y.; HIMMEL, M. E.; DING, S. Y. Coherent raman microscopy analysis of plant cell walls. **Methods in Molecular Biology**, vol. 908, p. 49–60, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-956-3_5.

ZHOU, C.; LI, Q.; CHIANG, V. L.; LUCIA, L. A.; GRIFFIS, D. P. Chemical and spatial differentiation of syringyl and guaiacyl lignins in poplar wood via time-of-flight secondary ion mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, vol. 83, no. 18, p. 7020–7025, 15 Sep. 2011. <https://doi.org/10.1021/ac200903y>.

ZOGLHAMI, A.; PAËS, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. **Frontiers in Chemistry**, vol. 7, 18 Dec. 2019. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>.