

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SECRETÔMICA E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA  
LINHAGEM SELVAGEM 2HH E DO MUTANTE S1M29 DE**

*Penicillium echinulatum*

**WILLIAN DANIEL HAHN SCHNEIDER**

Caxias do Sul

2014

**WILLIAN DANIEL HAHN SCHNEIDER**

**SECRETÔMICA E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA  
LINHAGEM SELVAGEM 2HH E DO MUTANTE S1M29 DE**

***Penicillium echinulatum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Marli Camassola

**Co-orientador:** Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Caxias do Sul

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

S359s Schneider, Willian Daniel Hahn, 1989-  
Secretômica e atividades enzimáticas da linhagem selvagem 2HH e  
do mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum* / Willian Daniel Hahn  
Schneider. – 2014.  
143 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.  
Orientador: Profa. Dra. Marli Camassola ; coorientador: Prof. Dr.  
Aldo José Pinheiro Dillon.

1. Penicillium. 2. Fungos. 2. Celulase. 4. Microrganismos. I. Título.

CDU 2. ed.: 582.282.123.2

Índice para o catálogo sistemático:

1. Penicillium	582.282.123.2
2. Fungos	582.28
3. Celulase	576.3
4. Microrganismos	579.266

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

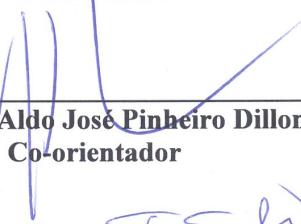
WILLIAN DANIEL HAHN SCHNEIDER

**Secretômica e atividades enzimáticas da linhagem selvagem  
2HH e do mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando a  
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05 DE DEZEMBRO DE 2014.**

  
Marli Camassola  
Profa. Dra. Marli Camassola  
Orientadora

  
Aldo Jose Pinheiro Dillon  
Prof. Dr. Aldo Jose Pinheiro Dillon  
Co-orientador

  
Edivaldo Ximenes Ferreira Filho  
Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

  
Marcio Antonio Mazutti  
Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

  
Eloane Malvessi  
Profa. Dra. Eloane Malvessi

***“Porque ele está lá!”***

George Mallory (1886-1924) quando perguntado

o porquê ele queria escalar o Everest.

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Claudio e Ireni e aos meus irmãos Arthur e  
Tatiane, pelo companherismo, apoio e admiração; e  
ao meu avô, Anselmo, que na reta final de sua vida,  
orgulha-se em ter a oportunidade de ver seu  
primeiro neto tornando-se Mestre.*

## AGRADECIMENTOS

Deixo aqui meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desta caminhada, que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

A Deus, o arquiteto do Universo, por guiar a minha caminhada, permitindo-me essa realização pessoal e profissional.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Marli Camassola e Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, pela orientação, dedicação e pela confiança depositada no meu trabalho. Em especial, a Profa. Dra. Marli Camassola, pelos inúmeros cafés e chocolate-quente compartilhados no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) entre os intervalos de um experimento e outro.

Aos professores da banca de acompanhamento, Profa. Dra. Eloane Malvessi e Profa. Dra. Mariana Roesch Ely, pelas sugestões e contribuições neste trabalho; e aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti e Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, pela correção e também contribuições dadas ao mesmo.

Aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassa pela amizade e companheirismo, à Dra. Roselei Claudete Fontana, técnica do laboratório e à Me. Laísa dos Reis, pelas dicas e ajudas oferecidas no desenvolvimento deste trabalho. De forma especial, à Me. Daiane Menegol e à Biol. Angélica Luisi Scholl, pela parceria até altas horas no laboratório.

À minha família, meu porto seguro, que sempre proporcionou o melhor para mim, estando sempre ao meu lado e acreditando em mim.

Ao apoio estrutural da Universidade de Caxias do Sul e financeiro do CNPq, CAPES e FAPERGS e FAPESP.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, pela oportunidade de desenvolver grande parte do trabalho prático e ao pesquisador Dr. Fabio Squina, por aceitar o desafio de desvendar mistérios escondidos por trás do fungo *Penicillium echinulatum*.

Aos amigos Thiago Augusto Gonçalves e Cristiane Akemi Uchima do CTBE, minha profunda gratidão, pela amizade construída, pela parceria neste trabalho e por me acolherem tão bem nas estadias em Campinas, tornando a jornada intensa de trabalho, menos cansativa.

E por último, mas não menos importante, ao fungo *Penicillium echinulatum*, com o qual iniciei a minha vida científica e me oportunizou descobertas interessantes e importantes, tornando minha carreira acadêmica mais prazerosa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento dessa dissertação de mestrado, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
NOMENCLATURAS .....	vi
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Demanda energética .....	3
2.2 Biomassa lignocelulósica.....	6
2.2.1 Celulose.....	7
2.2.2 Hemicelulose.....	7
2.2.3 Pectina.....	8
2.2.4 Lignina.....	8
2.3 Enzimas lignocelulolíticas .....	9
2.3.1 Enzimas ativas sobre carboidratos .....	11
2.3.2 Enzimas e proteínas acessórias .....	12
2.3.3 Módulo de ligação ao carboidrato (CBM) .....	12
2.4 Características e aplicações das enzimas lignocelulolíticas .....	13
2.4.1 Características e aplicações das celulases .....	13
2.4.2 Características e aplicações das hemicelulases .....	16
2.4.3 Características e aplicações das pectinases .....	18
2.4.4 Características e aplicações das ligninases .....	20
2.5 Mecanismos de indução de celulases fúngicas.....	21
2.6 Fontes de carbono para a produção de celulases .....	22

2.7 Fungos filamentosos .....	25
2.7.1 Linhagens de <i>Penicillium echinulatum</i> .....	25
2.8 Genômica de linhagens fúngicas produtoras de enzimas .....	27
2.9 Proteômica de fungos filamentosos .....	29
2.10 Secretômica de fungos filamentosos .....	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 Linhagens.....	38
3.2 Crescimento e manutenção de linhagens .....	38
3.3 Produção de enzimas .....	38
3.4 Determinação direta do crescimento celular .....	39
3.5 Determinação indireta do crescimento celular .....	39
3.6 Determinações enzimáticas .....	40
3.6.1 Determinação de FPA ( <i>Filter Paper Activity</i> ) .....	41
3.6.2 Determinação de atividade sobre Avicel®, arabinana, carboximetilcelulose, <i>debranched</i> arabinana, galactomanana, laminarina, <i>larch</i> arabinogalactana, <i>locust bean gum</i> , pectina, <i>wheat</i> arabinoxilana, xiloglicano e manana.....	42
3.6.3 Determinação de atividades sobre liquenana e β-glucano .....	42
3.6.4 Determinação de atividades sobre xilana e <i>rye</i> -arabinoxilano .....	42
3.6.5 Determinação de atividades sobre pNPA, pNPC, pNPG e pNPX .....	43
3.6.6 Determinação de atividades sobre feruloil acetato .....	43
3.7 Determinação de proteínas solúveis totais.....	44
3.8 SDS-PAGE de proteínas totais .....	44
3.9 Digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas.....	45
3.10 Cromatografia líquida e espectrometria de massas .....	46
3.11 Análise dos resultados .....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
The potential of <i>Penicillium echinulatum</i> strains to the enzymes production for cell wall hydrolysis and their application in second-generation ethanol technologies .....	50

Abstract.....	50
1. Introduction .....	51
2. Material and methods .....	52
2.1 Growth and maintenance of <i>Penicillium echinulatum</i> strains .....	52
2.2 Production of enzymes.....	53
2.3 Direct determination of cell growth.....	53
2.4 Indirect determination of cell growth .....	54
2.5 Enzyme dosages .....	54
2.6 Analysis of the results .....	55
3. Results and Discussion.....	55
3.1 Variations in pH and mycelial growth .....	55
3.2 Enzymatic activities in cellulose substrates .....	57
3.3 Enzymatic activities in hemicellulose substrates .....	61
3.4 Enzymatic activity in pectin substrates .....	66
3.5 Feruloyl esterases activity.....	68
3.6 Amylase activity .....	68
4. Conclusion.....	69
References .....	69
Secretome analysis of <i>Penicillium echinulatum</i> strains reveals its potential for degradation of lignocellulosic biomass .....	75
Abstract.....	75
1. Introduction .....	76
2. Results .....	77
2.1 Electrophoretic profile of <i>P. echinulatum</i> .....	77
2.2 Profiling of the <i>P. echinulatum</i> secretome for lignocellulose degradation.....	79
2.3 Enzymatic analysis of the <i>P. echinulatum</i> secretome .....	86
3. Discussion .....	98

4. Conclusions .....	103
5. Materials and methods .....	104
5.1 Growth and maintenance of <i>Penicillium</i> strains .....	104
5.2 Production of enzymes.....	104
5.3 Enzyme dosages.....	104
5.4 Determination of total soluble proteins.....	106
5.5 SDS-PAGE of total proteins .....	106
5.6 Digestion of proteins for analysis by mass spectrometry .....	106
5.7 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry.....	107
References .....	108
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>122</b>
<b>6 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>123</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....</b>	<b>124</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Redução na emissão de gases causadores de efeito estufa, em comparação com a gasolina, por etanol produzido a partir de uma variedade de matérias-primas.	3
<b>Figura 2.</b> Etapas para a produção de biocombustíveis.	5
<b>Figura 3.</b> Ilustração da distribuição da celulose, hemicelulose, pectina e lignina em uma célula vegetal.	6
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de ação de enzimas que atuam na degradação da celulose.	14
<b>Figura 5.</b> Oxidação das cadeias de glicano em celulose pela enzima polissacarídeo monooxigenases (PMOs). A oxidação química é catalisada pela atividade combinada de celobiose desidrogenase (CDH) e PMOs, gerando cadeias de glicano clivadas.	14
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de ação de enzimas que atuam na degradação da celulose.	17
<b>Figura 7.</b> Ação de diferentes enzimas sobre diferentes estruturas que formam a pectina.	19
<b>Figura 8.</b> Modelo de indução de celulases em <i>P. purpurogenum</i> .	22
<b>Figura 9.</b> Microscopia eletrônica de varredura de <i>Penicillium echinulatum</i> em cultivo sólido.	26
<b>Figura 10.</b> Esquema das tecnologias ômicas, seus alvos de análise correspondente e seus respectivos métodos de estudo.	32
<b>Figura 11:</b> Metodologia empregada na análise do secretoma produzido pela linhagem selvagem 2HH e mutante S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> .	39
<b>Artigo 1:</b> <i>The potential of Penicillium echinulatum strains to the enzymes production for cell wall hydrolysis and their application in second-generation ethanol technologies</i>	
<b>Fig.1.</b> Variations in pH (A and B) and mycelial growth (C and D) of wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> in submerged cultures using different carbon sources.	56

<b>Fig 2.</b> Enzymatic activities in cellulose substrates of wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> in submerged cultures using different carbon sources.	58
<b>Fig 3.</b> Cellobiohydrolases (A – B) endoglucanases (C – F) and $\beta$ -glucosidases (G – H) secreted by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> in submerged cultures using different carbon sources.	61
<b>Fig.4.</b> Xylanases (A – D), $\beta$ -xylosidases (E – F) and xyloglucanases (G – H) secreted by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> in submerged cultures using different carbon sources.	62
<b>Fig.5.</b> Mannanases secreted by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> in submerged cultures using different carbon sources.	64
<b>Fig.6.</b> Pectinases (A–B), arabinanases (C – F), arabinofuranosidase (G – H) and esterases (I – J) secreted by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> in submerged cultures using different carbon sources.	67
<b>Supplementary material.</b> Endoglucanases (A – B), xylanases (C – D), mannanases (E – F), arabinanases (G – H) and amylase activities (I – J) of wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> in submerged cultures using different carbon sources.	74
<b>Artigo 2: Secretome analysis of <i>Penicillium echinulatum</i> strains reveals its potential for degradation of lignocellulosic biomass</b>	
<b>Figure 1 Electrophoretic profile of <i>Penicillium echinulatum</i> grown on SCB and cellulose at 96h.</b> On the left (A), 1-D PAGE of wild type 2HH and on the right (B) 1-D PAGE of the mutant strain S1M29. I, II and III refer to triplicate. M – molecular marker, kDa – molecular weight.	78
<b>Figure 2 Electrophoretic profile of <i>Penicillium echinulatum</i> grown on glucose and glycerol at 96h.</b> One replicate for glucose and glycerol was performed and profiles of wild type 2HH and mutant S1M29 are shown intercalary in the gel above. M – molecular marker, kDa – molecular weight.	78
<b>Figure 3 Distribution of proteins identified in secretome of <i>Penicillium echinulatum</i> strains.</b> The proteins were classified according to CAZy database. The CAZy families identified in the wild type are representing in (A) and (B) representing the CAZy families identified in the mutant.	80

<b>Figure 4 Venn diagram of secretome from <i>Penicillium echinulatum</i> wild type 2HH.</b> Distribution of 147 proteins identified in the secretome of wild type, exclusive in each carbon source or shared between them. GLU – glucose, GLY – glycerol, CEL – cellulose and SCB – sugar cane bagasse.	81
<b>Figure 5 Venn diagram of secretome from <i>Penicillium echinulatum</i> mutant S1M29.</b> Distribution of 129 proteins identified in the secretome of mutant strain, exclusive in each carbon source or shared between them. GLU – glucose, GLY – glycerol, CEL – cellulose and SCB – sugar cane bagasse.	82
<b>Figure 6 Distribution of GHs families in <i>Penicillium echinulatum</i> secretome.</b> The proteins were classified according to CAZy database. A- GHs identified in wild type 2HH, B- GHs identified in mutant S1M29.	83
<b>Figure 7 Heat map showing the difference between the two strains of the major lignocellulolytic enzymes identified in the secretome.</b> The color of each enzyme related to spectra abundance in the different growth conditions (GLU- glucose, GLY – glycerol, SCB – sugar cane bagasse, CEL – cellulose), varying from a minimum (red) to maximum (green) abundance.	86
<b>Figure 8 Specific enzymatic activities of <i>Penicillium echinulatum</i> strains in submerged cultures using different carbon sources at 96h.</b> The graphs on the left (A) correspond to the wild type 2HH and on the right (B) correspond to the mutant strain S1M29. The hydrolytic potential of the broths of <i>Penicillium echinulatum</i> strains were tested on different substrates. The names of substrates employed are described in the section Abbreviations of this article.	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Algumas enzimas fúngicas envolvidas na degradação da lignocelulose.	10
<b>Tabela 2.</b> Comparação na produção de celulases empregando diferentes microrganismos e substratos.	24
<b>Tabela 3.</b> Análise proteômica de sistemas enzimáticos lignocelulolíticos produzidos por fungos ascomicetos.	30
<p><b>Artigo 2:</b> <i>Secretome analysis of Penicillium echinulatum strains reveals its potential for degradation of lignocellulosic biomass</i></p>	
<b>Table 1.</b> Identified cellulose-degradation/modifying enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	90
<b>Table 2.</b> Identified hemicellulose-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	91
<b>Table 3.</b> Identified pectin-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	92
<b>Table 4.</b> Identified hemicellulose/pectin-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	93
<b>Table 5.</b> Identified lignin-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	94
<b>Table 6.</b> Identified starch-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	95
<b>Table 7.</b> Identified fungal cell wall degradation/modifying enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	96

<b>Table 8.</b> Identified enzymes involved in plant cell wall modifications and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	97
<b>Table 9.</b> Comparison between secretomic profile of different <i>Penicillium echinulatum</i> strains	100
<b>Additional file 1.</b> Other proteins identified and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	114
<b>Additional file 2.</b> Other proteins identified (Miscellaneous) and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of <i>Penicillium echinulatum</i> at 96 h during submerged cultivation.	118

## NOMENCLATURAS

**Etanol 1G** – etanol de primeira geração

**Etanol 2G** – etanol de segunda geração

**INCT-Bioetanol** – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

**CAZy** – *carbohydrate active enzymes*

**GHs** – glicosil hidrolases

**GTs** – glicosil transferases

**PLs** – polissacarídeo liases

**CEs** – carboidratos esterases

**AAs** – atividades auxiliares

**CBMs** – módulos de ligação ao carboidrato

**CBDs** – domínios ligantes de celulose

**PMOs** - polissacarídeo monooxigenases

**CMO** – celulose monooxigenase

**CDH** – celobiose desidrogenase

**OS** – oligossacarídeos

**IBGL** –  $\beta$ -glicosidase intracelular

**CBH** – celobiohidrolase

**EG** – endo- $\beta$ -1-4-glicosidase

**EX** – endo- $\beta$ -1-4-xilanase

**XG** – xiloglicanase

**BX** –  $\beta$ -xilosidase

**ABF** – arabinofuranosidase

**AGA** –  $\alpha$ -galactosidase

**AMY** – amilase

**CHI** – quitinase

**PEP** – peptidase

**FPA** – atividade sobre papel filtro

**$\rho$ NPC** –  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo

**$\rho$ NPG** –  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranósídeo

**$\rho$ NPX** –  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranósídeo

**$\rho$ NPA** –  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-arabinofuranosídeo

**DNS** – ácido dinitrosalicílico

- SAB** – tampão acetato de sódio
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- DMAB** – 4-dimetilaminobenzaldeido
- BSA** – albumina sérica bovina
- SDS-PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio
- 1DE** – eletroforese unidimensional
- 2DE** – eletroforese bidimensional
- M** – marcador molecular
- kDa** - kilodaltons
- Da** – daltons
- Mb** – megabases
- DTT** – ditiotreitol
- IAA** – iodoacetomida
- LC-MS/MS** – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
- Q-Tof** – quadrupolo-tempo de voo
- FDR** – taxa de falsa descoberta
- BLAST** – *Basic Local Alignment Search Tool*
- dbCAN** – *DataBase for Carbohydrate-active enzyme ANotation*
- YLoc** – *Interpretable Subcellular Localization Prediction*
- qRT-PCR** – PCR quantitativo em tempo real
- BCA/SCB** – bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor
- CEL** – celulose
- GLY** – glicerol
- GLU** – glicose
- AVI** – Avicel®
- LIC** – liquenana
- CMC** – carboximetilcellulose
- ARAX** – *rye* arabinoxilana
- XIL** – xilana
- MAN** – manana
- PEC** – pectina
- FEA** – feruloil acetato
- PST** – amido de batata

## RESUMO

O emprego de enzimas lignocelulolíticas secretadas por microrganismos para a produção de etanol de segunda geração tem motivado pesquisas na área da engenharia de processos fermentativos, genômica e secretômica. Entre os microrganismos com potencial para a produção de celulases destacam-se variantes genéticos do fungo filamentoso *Penicillium echinulatum* caracterizados por produzirem altos títulos enzimáticos. Neste trabalho, estudou-se a secretômica da linhagem selvagem 2HH e do mutante S1M29 de *P. echinulatum*, em cultivo submerso, empregando diferentes fontes de carbono: glicose, glicerol, celulose e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Análises enzimáticas possibilitaram identificar que *P. echinulatum* produz celulases, hemicelulases, esterases e, em menor proporção, pectinases e amilases. Outrossim, os maiores títulos enzimáticos para a maioria das enzimas foram verificados na linhagem mutante. Nos meios formulados com bagaço de cana-de-açúcar ou celulose verificou-se a indução das maiores produções enzimáticas para ambas as linhagens. A análise do secretoma por 1D-PAGE seguido de LC-MS/MS das amostras de 96 horas de cultivo permitiu identificar que em ambas as linhagens há predominância de enzimas CAZy, sendo celulases, hemicelulases e enzimas degradadoras de parede celular fúngica as mais predominantes. Celobiohidrolases, endoglicanases,  $\beta$ -glicosidases, xilanases,  $\beta$ -xilosidases e mananases foram identificadas e, em quantidades menores, ligninases, pectinases, amilases, esterases e solenina, entre outras proteínas (adesão, chaperonas, oxidoredutases, proteases, peptidases, lipases, glutaminases e hipotéticas). Os meios elaborados com glicose ou glicerol foram utilizados pelo fungo para a produção de amilases, ligninases e enzimas degradadoras da parede celular fúngica. Destaca-se a secreção 2 a 3 vezes maior de celulases pela linhagem mutante, sendo que o meio de cultivo elaborado com bagaço de cana-de-açúcar proporcionou a secreção de maiores quantidades de celulases para o mutante. Nesta condição, o complexo celulolítico da linhagem S1M29 constitui-se de 55% de celobiohidrolases, 38% de endoglicanases e 1% de  $\beta$ -glicosidases. Estes dados sugerem que durante o melhoramento genético do fungo ocorreram mudanças, embora não direcionais, possivelmente em nível da regulação da expressão gênica, modificações pós-traducionais e alterações na capacidade para secretar proteínas extracelulares que tornaram a linhagem mutante S1M29 com potencial para ser empregada na hidrólise de lignocelulósicos.

## ABSTRACT

The use of lignocellulolytic enzymes secreting by microorganisms for the production of second-generation ethanol has motivated research in the field of fermentation processes engineering, genomics and secretomics. Among the microorganisms with the potential for cellulases production are genetic variants of the filamentous fungus *Penicillium echinulatum* characterized by produce high enzymatic titers. In this work, it was studied the secretome of the wild type 2HH and mutant S1M29 of *P. echinulatum* in submerged cultivation on different carbon sources: glucose, glycerol, cellulose and sugar cane bagasse pretreated by steam explosion). Enzymatic analysis allowed verifying that *P. echinulatum* produces cellulases, hemicellulases, esterases, and minor proportion, pectinases and amylases. Furthermore, the major enzymes titers for most enzymes dosed were verified in the mutant strain. It was verified in the media formulated with sugar cane bagasse or cellulose the induction of the highest enzyme production for both strains. The analysis of secretome by 1D-PAGE followed by LC-MS/MS, of samples collected at 96 hours of cultivation, showed that in both strains there is a predominance of CAZy enzymes, being cellulases, hemicellulases and fungal cell wall degrading enzymes the most prevalent. Cellobiohydrolases, endoglucanases,  $\beta$ -glucosidase, xylanase, endoxylanase,  $\beta$ -mannanases and xylosidases were identified and, in smaller amounts, ligninases, pectinases, amylases, esterases and swollenin, among other proteins (adhesion, chaperones, oxidoreductases, proteases, peptidases, lipases, glutaminases and hypothetical). The media elaborated with glucose or glycerol were used for producing of amylases, ligninases and fungal cell wall degrading enzymes. Highlights the secretion of 2-3 times more cellulases by the mutant, being the medium prepared with sugar cane bagasse afforded the secretion of large cellulases quantities for the mutant. In this condition, the cellulolytic complex of S1M29 strain consists of 55% cellobiohydrolases, 38% endoglucanases and 1%  $\beta$ -glucosidase. These data suggest that during the genetic improvement of the fungus changes occurred, although not directional, possibly at the level of regulation of gene expression, post-translational modifications and changes in the ability to secrete extracellular proteins, that have made the mutant S1M29 a potential strain to be employed in hydrolysis of lignocellulose.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vem ocorrendo um grande esforço no desenvolvimento de tecnologias para a produção do etanol de segunda geração (etanol 2G), obtido a partir da fermentação de açúcares presentes em resíduos da produção de cana-de-açúcar, do milho e de outros resíduos lignocelulósicos. A biomassa lignocelulósica, devido a grande disponibilidade e baixo custo, torna-se uma contribuição relevante para o sucesso da tecnologia do etanol 2G, com consequente aumento da produção do combustível, sem aumentar a área cultivada.

A estrutura de carboidratos da parede celular de plantas precisa ser despolimerizada em açúcares mais simples para a sua aplicação em processos industriais, incluindo a produção de etanol. Todavia para o aproveitamento de carboidratos, há necessidade de pré-tratamento do material lignocelulósico e a ação de diversas enzimas – celulases, hemicelulases, pectinases, ligninases, esterases – visando a liberação de açúcares para a fermentação alcoólica. O papel das enzimas lignocelulolíticas na degradação da parede celular da planta é muito importante e, havendo a disponibilidade de tecnologia de uso de lignocelulósicos, o volume necessário destas enzimas será aumentado consideravelmente.

A capacidade dos fungos filamentosos de secretar um *pool* de proteínas tem motivado o seu emprego para a produção de enzimas industriais. Entre os microrganismos mais estudados e utilizados para a produção de enzimas para hidrólise da parede celular vegetal, estão as linhagens mutantes de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Neurospora crassa*. Linhagens de *Penicillium echinulatum* também são reconhecidas pela produção destas enzimas, visto que mutantes celulolíticos de *P. echinulatum* apresentam um complexo enzimático com estabilidade térmica a 50 °C e uma proporção equilibrada de atividade sobre papel filtro (FPA) e β-glicosidases, condições relevantes para a hidrólise da celulose. Entre os mutantes, destaca-se a linhagem S1M29 de *P. echinulatum* que apresenta as maiores secreções enzimáticas quando cultivado em celulose ou bagaço de cana-de-açúcar, suplementando com farelo de trigo.

A caracterização dos genomas de organismos foi uma das principais contribuições da Ciência dos recentes anos 90. Com os avanços na área da genômica associados com os estudos na área da bioinformática, novas tecnologias de investigação ainda mais minuciosas de microrganismos foram desenvolvidas, denominada de “era pós-genômica”, o que inclui a metabolômica, a proteômica, a transcriptômica, a secretômica, entre outros estudos. A análise do secretoma de fungos filamentosos auxilia no entendimento da fisiologia do microrganismo e pode contribuir para o melhoramento de linhagens com fins biotecnológicos. Até o presente

momento, um único trabalho de secretômica envolvendo a linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum* foi realizado, sendo que enzimas do complexo celulolítico e outras envolvidas na conversão de biomassas em biocombustíveis foram identificadas. Visto o potencial de *P. echinulatum* na produção de enzimas para etanol 2G, é de suma importância o desenvolvimento de estudos de seu secretoma.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças nas atividades enzimáticas e no secretoma da linhagem selvagem 2HH e do mutante S1M29 de *P. echinulatum* em cultivo submerso, empregando diferentes fontes de carbono, tendo como objetivos específicos:

- avaliar o pH, o crescimento micelial e as atividades de diferentes enzimas envolvidas na degradação de parede celular, a partir de cultivo submerso com a linhagem selvagem e o mutante de *P. echinulatum*, empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, celulose, glicose e glicerol como fontes de carbono;
- comparar, através de eletroforese unidimensional, o perfil proteico do secretoma da linhagem selvagem e do mutante de *P. echinulatum*, em 96 horas de cultivo, empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, celulose, glicose e glicerol como fontes de carbono;
- identificar proteínas dos perfis unidimensionais do secretoma da linhagem selvagem e do mutante de *P. echinulatum*, utilizando a metodologia de análise proteômica de *shotgun*.

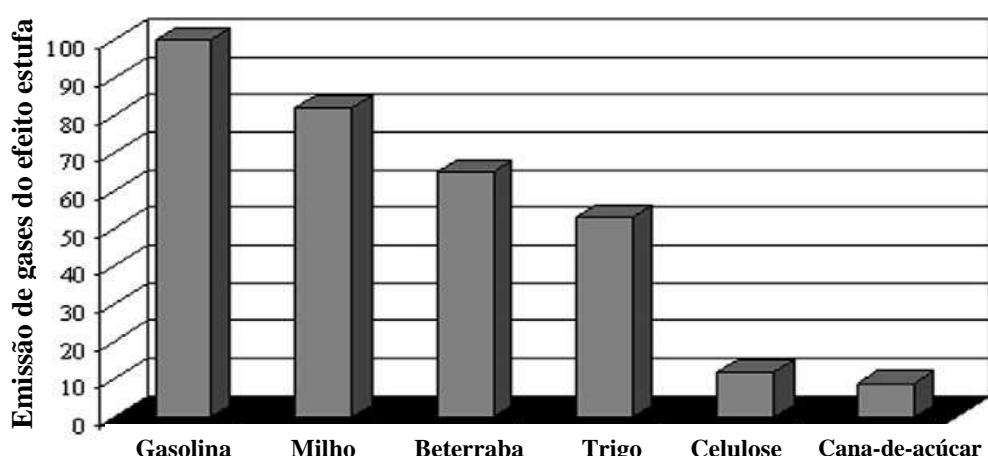
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Demanda energética

A demanda global por energia vem aumentando rapidamente devido ao crescimento populacional, ao aumento nos padrões de vida e ao rápido desenvolvimento industrial nos países emergentes (Öhgren *et al.*, 2007). Este rápido desenvolvimento afeta a estabilidade dos ecossistemas, o clima global, bem como as reservas globais de petróleo, culminando em impactos ambientais e em aumento no preço do petróleo (Balat, 2011).

Entre as alternativas mais promissoras para atender a demanda por combustíveis e reduzir os gases causadores do efeito estufa é a utilização de etanol, que tem atraído a atenção mundial devido ao seu potencial como combustível automotivo alternativo (Takahashi *et al.*, 2000). Este etanol de primeira geração (etanol 1G) é produzido a partir da conversão dos monossacarídeos provenientes da hidrólise da sacarose e do amido presentes em culturas como a do milho, da beterraba e da cana-de-açúcar (Trostle, 2009).

Nem todos os combustíveis são iguais em termos de benefícios ambientais. Na Figura 1 verificam-se menores emissões de gases causadores do efeito estufa resultantes da utilização de combustíveis com relação à gasolina. Como demonstrado, o etanol produzido a partir do milho oferece benefícios limitados, uma vez que ocorre uma redução desses gases em apenas 18% quando comparado com a gasolina. Em contraste, a cana-de-açúcar e o etanol celulósico (etanol 2G) resultam em emissões 90% inferiores com relação à gasolina (Balat, 2011).



**Figura 1.** Redução na emissão de gases causadores de efeito estufa, em comparação com a gasolina, por etanol produzido a partir de uma variedade de matérias-primas (Philippidis, 2008).

Levando em consideração que o gás carbônico emitido com a queima de etanol pode ser reabsorvido pela própria cana-de-açúcar ou outros vegetais (Santos *et al.*, 2012), estima-se

que 10% de etanol acrescido à gasolina poderia reduzir a emissão de gás carbônico de 3-6% (Singhania *et al.*, 2010). Assim, para o consumo atual de gasolina, que é em torno de 5 trilhões de litros por ano, seriam necessários 500 bilhões de litros de etanol. No entanto, a produção mundial de etanol em 2013 foi de 74 bilhões de litros (GloboMeter, 2014).

Uma quarta fonte de açúcares, os resíduos lignocelulósicos, apresentam potencial para tornarem-se a fonte mais viável para atender a atual demanda energética, pois a matéria-prima é abundante, renovável e não é utilizada na alimentação da população e de animais. Nos últimos anos, houve um grande esforço da comunidade científica para o desenvolvimento de novos processos economicamente viáveis para o aproveitamento do componente lignocelulósico da biomassa, caso dos resíduos agrícolas (palha e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e resíduos de milho), resíduos florestais (pó e restos de madeira) e biomassas energéticas, como o capim-elefante, para a produção de etanol 2G (Santos *et al.*, 2012).

Um relatório do Fórum Econômico Mundial, intitulado “O Futuro das Biorrefinarias”, conclui que a conversão de biomassa em combustíveis, energia e produtos químicos pode gerar mais de US\$ 230 bilhões na economia global até 2020 e com a expansão da produção das biorrefinarias de larga escala, a dependência dos combustíveis fósseis pode se reduzir drasticamente (Business Wire, 2014).

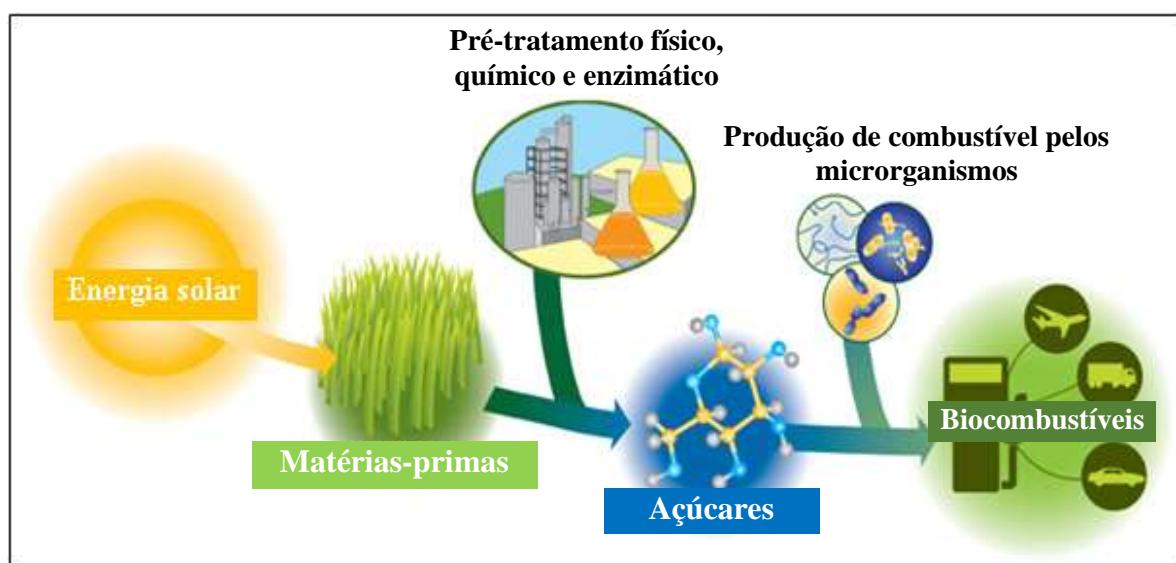
Nesta perspectiva, a evolução global dos combustíveis de segunda geração motivou a construção da primeira usina de etanol celulósico do mundo. Iniciativa da *Beta Renewables*, líder global em biocombustíveis de segunda geração e parte do *Grupo Mossi & Ghisolfi*, e da maior produtora mundial de enzimas industriais, a dinamarquesa *Novozymes*, a usina foi inaugurada oficialmente em outubro de 2013, perto da cidade de Crescentino, no norte da Itália, com capacidade para produzir 75 milhões de litros de etanol celulósico por ano (UNICA, 2014).

Segundo informações do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (INCT-Bioetanol), o etanol 2G é a principal aposta nacional para aumentar a oferta do produto sem que seja preciso elevar a área plantada de cana-de-açúcar. Isso porque o etanol 2G brasileiro será produzido da celulose obtida da palha e do bagaço de cana-de-açúcar, ou seja, as sobras do processo atual de produção de etanol. Recentemente foi inaugurada a primeira usina de etanol celulósico em escala comercial no Brasil, o que representa um grande avanço para o nosso país porque o coloca entre os países que já tem planos concretos de utilização dessa tecnologia. A fábrica de São Miguel dos Campos, em Alagoas, tem capacidade de produção de 82 milhões de litros por ano. Até 2020, a GranBio pretende produzir cerca de 1 bilhão de litros por ano de etanol 2G no Brasil (BiofuelsDigest, 2014).

Como o Brasil é um dos países de megadiversidade em nível mundial, a disponibilidade de genes em microrganismos, capazes de produzir enzimas que ataquem a parede celular, é enorme. Uma das metas principais é identificar novas espécies e testar a ação de coquetéis enzimáticos e enzimas isoladas sobre a parede celular ou seus polissacarídeos isolados. Outro ponto importante será o melhoramento dessas enzimas, usando técnicas de biologia molecular para inclusive produzir enzimas multifuncionais (INCT, 2014).

Além do Brasil, diversos países do mundo vêm desenvolvendo estudos na área de prospecção de fungos e engenharia de enzimas. Os Estados Unidos iniciou a execução do projeto *1000 Fungal Genome*, que agrupa diversas instituições norte-americanas em torno do sequenciamento de 1000 espécies de fungos até 2016, justamente em função destes microrganismos serem os principais secretores de enzimas que degradam a biomassa em açúcares que podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis (JGI, 2014).

O processo para a conversão do material lignocelulósico a etanol (Figura 2) requer três importantes etapas: (1) deslignificação - liberação a celulose e a hemicelulose que estão associadas à lignina; (2) hidrólise - despolimerização dos polímeros de carboidratos com liberação de açúcares livres (glicose e xilose); e (3) fermentação - produção de etanol (Lee, 1997). Portanto, microrganismos que são capazes de fermentar glicose e xilose simultaneamente, são necessários para uma eficiente bioconversão da biomassa em etanol (Liu *et al.*, 2013).

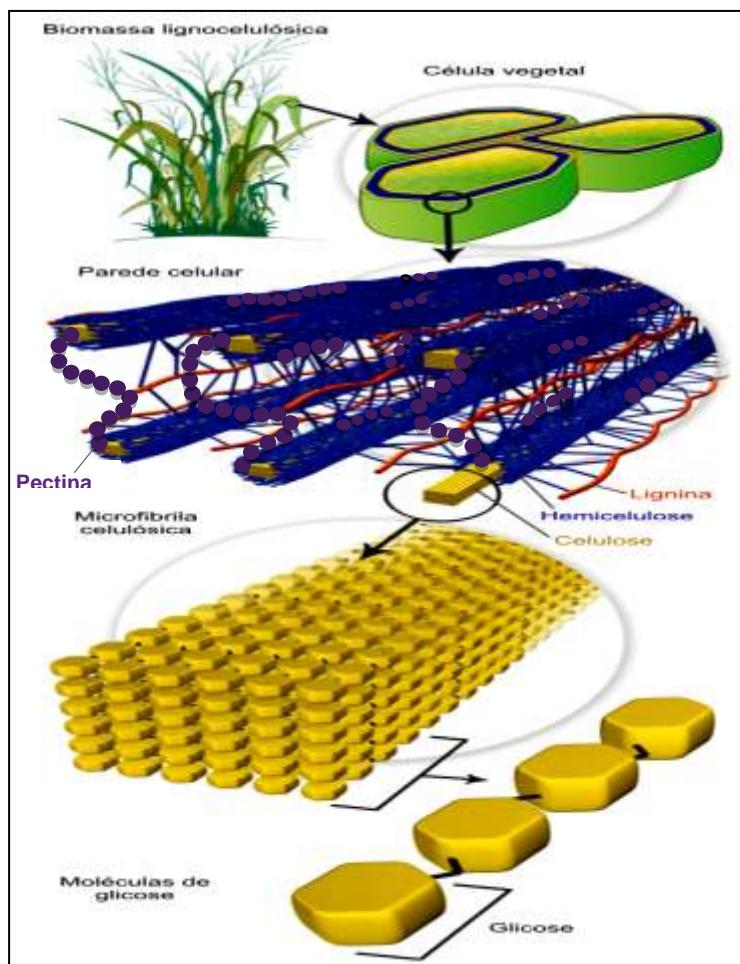


**Figura 2. Etapas para a produção de biocombustíveis.** A energia solar é coletada pelas plantas via fotossíntese e armazenada como lignocelulose. A decomposição do material celulósico e hemicelulósico em pentoses e hexoses é obtida por pré-tratamentos físicos e químicos, acompanhados pela exposição das enzimas de microrganismos degradadores de biomassas. Os açúcares simples podem ser subsequentemente convertidos em biocombustíveis por microrganismos (Rubin, 2008).

## 2.2. Biomassa lignocelulósica

A matéria vegetal lignocelulósica é o mais abundante material presente na Terra e é composta por quatro grandes blocos poliméricos: a polifenol lignina e três polissacarídeos: celulose, hemicelulose e pectina. Em combinação com enzimas associadas à parede celular vegetal, proteínas estruturais e proteoglicanos, estes componentes formam uma rede intricada que fornece resistência e durabilidade para a parede celular vegetal (Popper *et al.*, 2011).

A celulose, a hemicelulose e a lignina são os três maiores constituintes da parede celulares dos vegetais, unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (Figura 3). Estes três componentes das paredes celulares vegetais constituem 97-99% da massa seca dos lignocelulósicos e as proporções podem ser distintas dependendo do vegetal (Mosier *et al.*, 2005). Outros componentes poliméricos como amido e pectina estão presentes em menores quantidades (Martín *et al.*, 2007). A composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e 1-2% de pectina (Fengel *et al.*, 1989).



**Figura 3. Ilustração da distribuição da celulose, hemicelulose, pectina e lignina em uma célula vegetal, adaptada de Kondo *et al.* (1997).**

## 2.2.1 Celulose

A celulose é o polímero natural de maior ocorrência no mundo. A sua estrutura pode ser classificada em três níveis organizacionais. O primeiro é definido pela sequência de resíduos  $\beta$ -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações  $\beta$ -D (1→4) glicosídicas, de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . O segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. O terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em um grande número de outros solventes (Santos *et al.*, 2012).

As regiões de celulose cristalina, região mais compacta devido às ligações de hidrogênio e de difícil degradação enzimática, são separadas por regiões de menor organização, denominadas amorfas. As regiões de celulose amorfa apresentam baixa resistência aos ataques químicos e biológicos, sendo, portanto, pontos de degradação (Fan *et al.*, 1980).

## 2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo de baixa massa molecular, compreendendo 30% a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, e tem como função ligar as microfibrilas de celulose (Coughlan & Hazlewood, 1993). Esse polímero apresenta uma estrutura mais diversificada que a celulose (Karnaouri *et al.*, 2014), sendo estruturalmente mais semelhante à celulose do que a lignina. Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais inorgânicos comumente utilizados como catalisadores. Essa reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo desses polissacarídeos (Santos *et al.*, 2012).

Os componentes hemicelulósicos da parede celular vegetal incluem uma grande variedade de heteropolissacarídeos com estruturas lineares e/ou ramificadas e geralmente são classificados de acordo com o principal açúcar presente na sua composição (Glass *et al.*, 2013). Entre os polímeros constituintes estão as pentoses (xilose, ramnose, arabinose), as hexoses (manose, glicose, galactose) e os açúcares ácidos (ácidos urônicos). Esses açúcares

estão ligados entre si, por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3. Essas ligações entre os monômeros da hemicelulose são facilmente hidrolisáveis (Pérez *et al.*, 2002).

As xilanás são as hemiceluloses mais abundantes e se constituem de heteropolissacarídeos formados por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4 e, ocasionalmente, por ligações do tipo  $\beta$ -1,3, em algas. A xilana se encontra localizada entre a molécula de lignina e o conjunto de fibras de celulose (Beg *et al.*, 2001).

### **2.2.3 Pectina**

A pectina é um polissacarídeo complexo contendo como cadeia principal monômeros de ácido D-galacturônico  $\alpha$ -1,4 ligados. A pectina é constituída de, no mínimo, 65% de ácido galacturônico, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura e a União Europeia (Canteri *et al.*, 2012). Entre os polissacarídeos da parede celular, a pectina tem a mais alta complexidade estrutural e funcional, com quatro principais classes estruturais: homogalacturonana, ramnogalacturonana I, xilogalacturonana e ramnogalacturonana II (Glass *et al.*, 2013).

A pectina está localizada na parede celular de vegetais superiores, associada a outros componentes. Essa parede pode ser dividida em duas camadas denominadas de primária e secundária. Dois modelos estruturais são propostos para a parede celular primária, cuja área de superfície aumenta durante a expansão da célula: tipo I, composto principalmente por celulose, xiloglucanas, extensina e pectina (20-35%) e tipo II, compreendendo essencialmente celulose, glicoarabinoxilanás e compostos fenólicos e menor proporção de pectina (10%). A parede secundária, estrutura complexa adaptada à função da célula, é formada internamente à parede primária na diferenciação (Canteri *et al.*, 2012).

Entre as paredes primárias de células vizinhas encontra-se uma estrutura denominada lamela média, formada por molécula de pectina, provavelmente de alta metoxilação, unidas por meio de ligações cruzadas, com camadas de cadeias de homogalacturonana depositadas subsequentemente em pectinas de células opostas. Os polissacarídeos pécticos são importantes no controle da porosidade da parede, na adesão de células subjacentes, no controle do ambiente iônico da parede celular, na aderência intercelular e o crescimento normal em plantas vasculares, bem como na defesa vegetal (Canteri *et al.*, 2012).

### **2.2.4 Lignina**

A lignina pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% da sua massa seca. Depois da

celulose, a lignina é a macromolécula mais abundante dentre as biomassas lignocelulósicas. É um heteropolímero amorfó que consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool *p*-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares. Em função dessa propriedade, essa macromolécula é de difícil degradação, quando comparado aos polissacarídeos. A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose. No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, consequentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (Santos *et al.*, 2012).

### **2.3 Enzimas lignocelulolíticas**

O estudo das enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal tem sido intensa desde os anos 1950. A degradação de materiais lignocelulósicos em açúcares monoméricos tem grande importância, uma vez que os açúcares fermentescíveis podem ser utilizados como matérias-primas em inúmeros processos biotecnológicos, incluindo a produção do etanol 2G (Lawford & Rousseau, 2003).

Na natureza, os fungos apresentam um papel central na degradação da biomassa de plantas produzindo um conjunto extensivo de enzimas que degradam carboidratos as quais são específicas na degradação de polissacarídeos de plantas. Entretanto, esses diferentes conjuntos diferem entre as espécies de fungos. Por exemplo, *T. reesei* apresenta um conjunto de enzimas altamente eficientes na degradação da celulose (Martinez *et al.*, 2008) enquanto que espécies de *Aspergillus* produzem muitas enzimas para degradar pectina (Martens-Uzunova & Schapp, 2009).

Comparadas com a maioria das outras enzimas industriais, a maior importância das enzimas lignocelulolíticas é a complexidade de sua composição (Tabela 1). Com relação à complexidade estrutural e composição química de materiais lignocelulósicos, as enzimas lignocelulolíticas produzidas por microrganismos são complexos enzimáticos contendo diversos tipos de enzimas degradadoras (Liu *et al.*, 2013).

Estas enzimas podem ser classificadas, de forma geral, como hidrolases e oxidases, que atuam de forma sinérgica na degradação da lignocelulose (Sanchez, 2009). Recentemente,

complexos enzimáticos lignocelulolíticos são produzidos principalmente por fungos ascomicetos na indústria (Gusakow, 2011).

**Tabela 1.** Algumas enzimas fúngicas envolvidas na degradação da lignocelulose (Liu *et al.*, 2013).

Enzima	Código da Enzima	Família CAZy <sup>a</sup>	Substrato <sup>b</sup>	Produto <sup>b</sup>
Celobiohidrolase	EC 3.2.1.91	GH6,7	Celulose	Celobiose
Endo- β-1-4-glicanase	EC 3.2.1.4	GH5,7,12,45	Celulose	Celodextrina, glicose
β-glicosidase	EC 3.2.1.21	GH1,3	Celodextrinas	Glicose
Celulose monooxigenase	-	- <sup>c</sup>	Celulose	Celodextrina oxidada
Celobiose monoxigenase	EC 1.1.99.18	-	Celobiose	Celobiono-1,5-lactona
Expansina	-	-	Celulose	Celulose rompida
Endo- β-1,4-xilanase	EC 3.2.1.8	GH10,11,30	Xilana	Xilo-OS, xilose
β-xilosidase	EC 3.2.1.37	GH3,30,43	Xilo-OS	Xilose
Exo-1,5-α-L-arabinase	EC 3.2.1.-	GH43,93	Arabinana	Arabino-OS, arabinose
Endo-1,5- α-L-arabinase	EC 3.2.1.99	GH43	Arabinana	Arabino-OS, arabinose
α-L-arabinofuranosidase	EC 3.2.1.55	GH3,43,51,54,62	Arabinana, arabino-OS, arabinoxilana	Arabinose
Endo-1,4-manase	EC 3.2.1.78	GH5,26	Manana	Mano-OS
β-manosidase	EC 3.2.1.25	GH2	Mano-OS	Manose
Endo- β-1,4-galactanase	EC 3.2.1.89	GH53	Galactana	Galacto-OS, galactose
β-galactosidase	EC 3.2.1.23	GH2,35	Galactana, xiloglicana	Galactose
α-galactosidase	EC 3.2.1.22	GH27,36	Galactomanana	Galactose
Xiloglicanase	EC 3.2.1.151	GH12,74	Xiloglicana	Xiloglicana-OS
Oligoxiloglucano reducing end- celobiohidrolase específica	EC 3.2.1.150	GH74	Xiloglicana OS	Celobiose (com ou sem substituição de xilosil)
Endo-1,3-1,4-glicanase	EC 3.2.1.6 EC 3.2.1.73	GH12,16	β-(1→3, 1→4)-glicana	Glico-OS
α-L-fucosidase	EC 3.2.1.63 EC 3.2.1.51	GH29,95	Xiloglicana	Fucose
α-glicuronidase	EC 3.2.1.139 EC 3.2.1.131	GH67	Glicuronoxilana	Ácido 4-O-metil glicurônico
Acetilxilana esterase	EC 3.1.1.72	CE1,2,3,5,12	Xilana	Ácido acético
Feruloil esterase	EC 3.1.1.73	CE1	Xilana, arabinana, xiloglicana	Ácidos hidroxicinâmicos (ex: ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico)
Glicuronoil esterase	EC 3.1.1.-	CE15	Xilana	Ácido 4-O-metil glicurônico
Lacase	EC 3.1.10.3.2	-	Lignina	Radicais aromáticos
Lignina peroxidase	EC 3.1.11.1.14	-	Lignina	Radicais aromáticos
Manganês peroxidase	EC 3.1.11.1.13	-	Lignina	Radicais aromáticos
Versátil peroxidase	EC 3.1.11.1.16	-	Lignina	Radicais aromáticos

<sup>a</sup> CAZy, base de dados de enzimas com atividade sobre carboidratos; GH, glicosil hidrolases; CE, carboidrato esterases.

<sup>b</sup> OS, oligossacarídeos.

<sup>c</sup> Classificação prévia como GH61 (endo- β-1,4-glicanases).

Nas últimas quatro décadas, diversos estudos, incluindo, principalmente mutagênese de linhagens, otimização de processos e suplementação de proteínas desconhecidas foram realizados para reduzir o custo de produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos (Merino & Cherry, 2007). No entanto, o progresso é relativamente lento devido à falta de compreensão suficiente do complexo de sistemas enzimáticos e linhagens produtoras de enzimas.

Os genomas de vários fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas já foram sequenciados nos últimos dez anos, permitindo estudos sistemáticos de seus sistemas enzimáticos. Com base no aumento de informações genômicas e proteômicas, mais enzimas foram identificadas para complementar eficientemente os sistemas enzimáticos originais (Liu *et al.*, 2013).

### **2.3.1 Enzimas ativas sobre carboidratos**

As enzimas ativas sobre carboidratos (do inglês, CAZy, *Carbohydrate Active Enzymes*) são enzimas que degradam biomassa e podem ser organizadas em diferentes famílias baseadas na sua sequência de aminoácidos dos módulos catalíticos estruturalmente relacionados (CAZy, 2014). Este banco de dados abrange as Glicosil Hidrolases (GHs), responsáveis pela hidrólise e/ou rearranjo de ligações glicosídicas; Glicosil Transferases (GTs), responsáveis pela formação de ligações glicosídicas; Polissacarídeo Liases (PLs), as quais realizam clivagem não-hidrolítica de ligações glicosídicas; as Carboidratos Esterases (CEs): que hidrolisam ésteres de carboidratos; Atividades Auxiliares (AAs), enzimas redox que atuam em conjunto com outras enzimas CAZy e Módulos de ligação ao carboidrato (CBMs), proteínas que promovem a adesão da enzima ao carboidrato (CAZy, 2014).

As glicosil hidrolases, também conhecidas como hidrolases glicolíticas, são enzimas que quebram a cadeia enquanto outras proteínas, chamadas de acessórias, tais como as glicosil transferases, expansinas (ou soleninas), carboxilesterases e módulos de ligação a carboidratos auxiliam nas modificações de polissacarídeos (Cairo, 2012).

As glicosil hidrolases são enzimas de origens vegetal, microbiana e animal, responsáveis pela degradação de polissacarídeos contidos nas paredes celulares dos vegetais, tais como: celulose, hemiceluloses e pectinas. Essas enzimas são conhecidas como celulases, xilanases, pectinases, entre outras (Minic & Jouanin, 2005), possuindo-se muitos estudos sobre a função, estrutura, bioquímica e modo de ação dessas enzimas (Henrissat, 1995).

Apesar das enzimas dentro de uma mesma família dividirem similaridades em suas sequências, algumas podem conter múltiplas atividades. Por exemplo, a família GH5 apresenta atividades catalíticas de exoglicanases, endoglicanases e endomananases (Dias *et al.*,

2004). Além disso, uma enzima de atividade específica pode estar presente em muitas famílias CAZy. Isto é importante para a degradação eficiente dos polissacarídeos das plantas, pois as enzimas de cada família têm especificidade de substrato muitas vezes complementares. A anotação das enzimas ativas de carboidratos tem sido feita para muitos genomas de fungos, como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma reesei* e *Saccharomyces cerevisiae* (Martinez *et al.*, 2008).

### **2.3.2 Enzimas e proteínas acessórias**

Entre as enzimas e proteínas acessórias ativas em polissacarídeos destacam-se as transferases sacáridicas, expansinas e feruloil esterases (carboxilesterases). As transferases, mais conhecidas como xiloglicano transferase são responsáveis pelo elastecimento da parede celular vegetal, permitindo o crescimento da parede secundária em plantas de porte arbóreo (Cosgrove, 2005). As expansinas, conhecidas também como soleninas, são proteínas que possuem a capacidade de ligar-se a microfibrila de celulose e enfraquecer as ligações de hidrogênio entre os polímeros antiparalelos de celulose (Lee *et al.*, 2001). Essas são classificadas em  $\alpha$ -expansinas e  $\beta$ -expansinas de acordo com a sua estrutura de aminoácidos (Jones & McQueen-Mason, 2003). Baker *et al.* (2000) demonstraram que a adição de soleninas em uma reação de sacarificação com endoglicanases de *T. reesei* melhora a hidrólise da celulose reduzindo o tempo de conversão.

As feruloil esterases são enzimas do tipo carboxilesterases, as quais separam a hemicelulose da lignina através da quebra da ligação éster entre o ácido ferúlico e a hemicelulose presente no material lignocelulósico. Estes ácidos são os responsáveis pela ligação dos resíduos da hemicelulose, a resíduos fenólicos da lignina, servindo de ponte para a estabilização da parede celular (Koseki *et al.*, 2006). As feruloil esterases também atuam no rompimento de cadeias laterais da estrutura ramnogalacturonana I presente na pectina (Glass *et al.*, 2013). Desta forma, esterases são de grande importância para a desestabilização da biomassa lignocelulósica, permitindo uma maior exposição dos polissacarídeos as hidrolases glicolíticas.

### **2.3.3 Módulo de ligação ao carboidrato (CBM)**

Muitas enzimas envolvidas na degradação da biomassa como as celulases e hemicelulases, necessitam se associar especificamente a substratos insolúveis para aumentar a eficiência da sua degradação (Tomme *et al.*, 1996). Essas enzimas apresentam módulos ou domínios de ligação a carboidratos, que mediam o efeito de aumento de proximidade da

enzima ao substrato (Bolam *et al.*, 1998). Sendo assim, a principal função do CBM é a imobilização da enzima na superfície polimérica aumentando, portanto, a concentração local do substrato e levando a uma catálise mais eficiente (Gill *et al.*, 1999).

Módulo de ligação a carboidrato é definido como uma sequência contínua de resíduos de aminoácidos contidos numa enzima com um discreto dobramento o qual possui atividade de ligação a carboidrato. Os CBMs foram anteriormente classificados como domínios ligantes de celulose (CBDs) baseando-se na descoberta de vários módulos que ligam celulose. Entretanto, módulos adicionais de enzimas com atividade em carboidratos estão continuamente sendo descobertos por ligarem outros carboidratos além da celulose e que, ainda assim, cumprem o critério do CBM, daí a necessidade de reclassificar esses polipeptídeos utilizando uma terminologia mais inclusiva. O termo CBD tem sido usado para descrever a subclasse de CBMs que ligam especificamente celulose (Boraston *et al.*, 2004).

Os CBMs são divididos em famílias com base na similaridade da sequência de aminoácidos (Henrissat, 1999). Atualmente estão definidas 71 famílias de CBMs que possuem uma variação substancial na especificidade de ligação (CAZy, 2014).

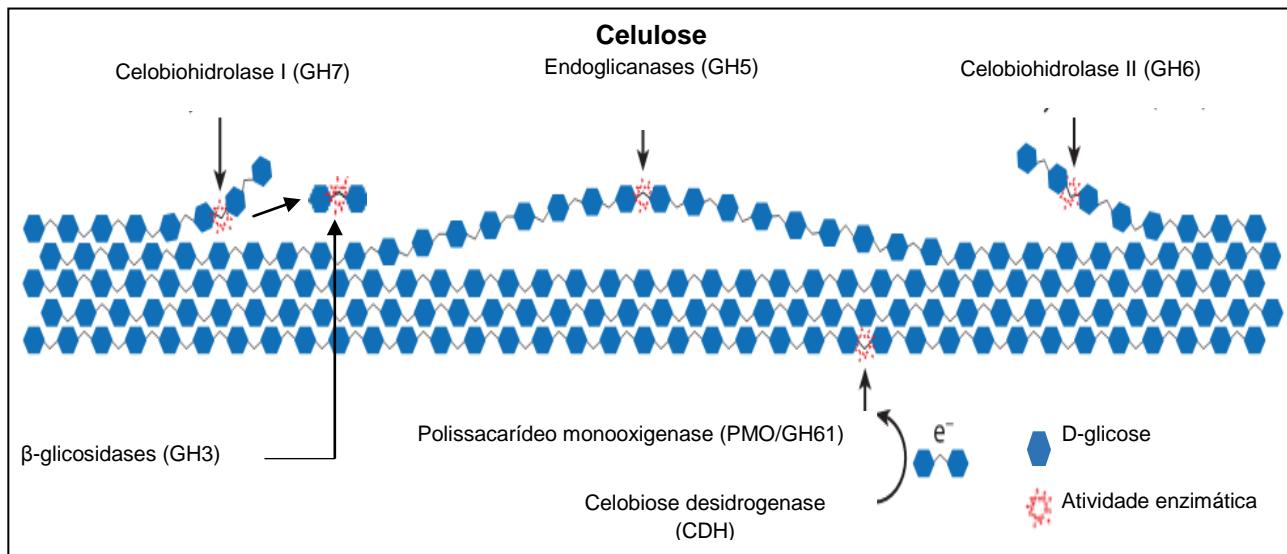
## **2.4 Características e aplicações das enzimas lignocelulolíticas**

### **2.4.1 Características e aplicações das celulases**

O complexo enzimático de celulases constitui-se de um conjunto de hidrolases glicosídicas, encontradas em secreções de microrganismos, como fungos e bactérias, plantas e de alguns animais como gastrópodes e insetos xilófagos. Estas enzimas são proteínas de massa molecular entre 20 e 240 kDa, capazes de romper ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 de microfibrilas da celulose, liberando moléculas de celobiose e glicose (Kubicek *et al.*, 2003).

O esquema clássico de degradação da celulose por fungos envolve endo-1,4- $\beta$ -glicanases (GH5), que clivam ligações internas da cadeia de celulose; exo-1,4- $\beta$ -glicanases ou celobiohidrolases (GH7 e GH6) que clivam moléculas de celobiose de extremidades redutoras e não redutoras da fibra de celulose; e  $\beta$ -glicosidases (GH3) que hidrolisam celobiose em duas moléculas de glicose (van den Brink & de Vries, 2011; Glass *et al.*, 2013).

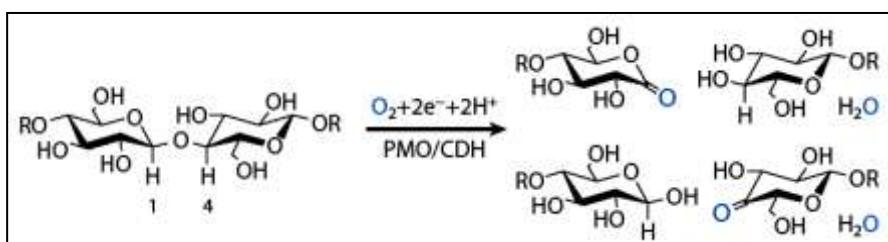
Na Figura 4 pode-se visualizar o modo de ação sinérgica do complexo enzimático na hidrólise da fibra de celulose.



**Figura 4.** Mecanismo de ação de enzimas que atuam na degradação da celulose (Cantarel *et al.*, 2009; van den Brink & de Vries, 2011; Glass *et al.*, 2013).

Essas três classes de enzimas estão divididas em oito famílias GH (Vlasenko *et al.*, 2010; De Vries *et al.*, 2011). *Aspergillus niger*, por exemplo, possui cinco endoglicanases dentro das famílias GH5 e 12, quatro cellobiohidrolases nas famílias 6 e 7 e treze  $\beta$ -glicosidases nas famílias 1 e 3. Em comparação, o fungo mais eficiente de degradação da celulose, o *T. reesei*, possui cinco cellobiohidrolases caracterizadas dentro das famílias 5, 7, 12 e 45, duas cellobiohidrolases altamente expressas nas famílias 6 e 7 e duas  $\beta$ -glicosidases caracterizadas nas famílias 1 e 3 (Martinez *et al.*, 2008; Kubicek *et al.*, 2011). Embora *T. reesei* não tenha o maior número de celulases, seu conjunto de enzimas é muito eficiente na quebra de celulose atuando através de sinergismo.

Contudo, a deconstrução da fibra de celulose também depende da ação das monooxigenases (Figura 5) também conhecidas como polissacarídeo monooxigenases (PMOs) anteriormente classificadas como endoglicanases (GH61), que catalisam a clivagem oxidativa da celulose na presença de um doador externo de elétrons (Quinlan *et al.*, 2011; Beeson *et al.*, 2012).



**Figura 5.** Oxidação das cadeias de glicano em celulose pela enzima polissacarídeo monooxigenases (PMO). A oxidação química é catalisada pela atividade combinada de cellobiose desidrogenase (CDH) e PMOs, gerando cadeias de glicano clivadas (Li *et al.*, 2012, apud Glass *et al.*, 2013).

Embora o mecanismo catalítico específico das PMOs é um tema de pesquisa atual (Horn *et al.*, 2012), as enzimas GH61 provavelmente recebem elétrons a partir da ação das celobioses desidrogenases (Sygmund *et al.*, 2012). Em *Neurospora crassa*, a deleção de um único gene da celobiose desidrogenase reduziu pela metade a atividade total de celulases secretadas pelo fungo, indicando que um sistema redox ativo é uma parte importante do mecanismo de celulases (Phillips *et al.*, 2011).

O interesse em utilizar as celulases na indústria foi despertado na década de 1960, quando se descobriu que preparados de enzimas extracelulares do fungo *T. reesei* eram responsáveis pela ação hidrolítica. A ideia de aproveitar estas enzimas na conversão de resíduos celulósicos em produtos de interesse alimentar e energéticos surgiu entre 1973 e 1979 (Bio & Farma, 2009).

Atualmente, as celulases vêm sendo empregadas na extração de óleos, essências e pigmentos vegetais, inclusão na composição de rações animais, produtos estimuladores de silagens, detergentes de uso doméstico, na produção de sucos, adjuvante para o malte da cerveja, componente farmacológico e na produção de protoplastos vegetais para a manipulação genética (Esterbauer *et al.*, 1991; Bhat, 2000; Han & He, 2010). Também podem ser empregadas na produção de xaropes de glicose que podem ser utilizados para diferentes fins biotecnológicos, destacando-se a produção de etanol por fermentação leveduriana (Kubicek *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 2007).

A aplicação potencial de celulases e de β-glicosidases na produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica vem sendo intensamente estudada e, apesar dos esforços, ainda não foi produzido um complexo enzimático econômico e eficiente, tratando-se de assunto amplamente conhecido e discutido no meio técnico-científico. A exigência de grande quantidade de enzimas no processo de hidrólise e o elevado custo de obtenção do complexo enzimático, que representa cerca de 40% do custo total da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, limita a produção do combustível em larga escala (Ahamed & Vermette, 2008; Deswal *et al.*, 2011).

Outra aplicação tecnológica das celulases que merece destaque é a bioestonagem que emprega as enzimas em tecidos e roupas de algodão tingidas com índigo, como os *blue jeans*, proporcionando maciez e um aspecto desbotado no tecido. Nessa técnica emprega-se o complexo de celulases ao invés de pedra pomes em máquinas de lavar industriais para tratar os tecidos (Bhat, 2000).

As celulases são a terceira maior enzima comercializada em todo o mundo, em termos de volume de dólares, devido às suas amplas aplicações já descritas. No entanto, as celulases

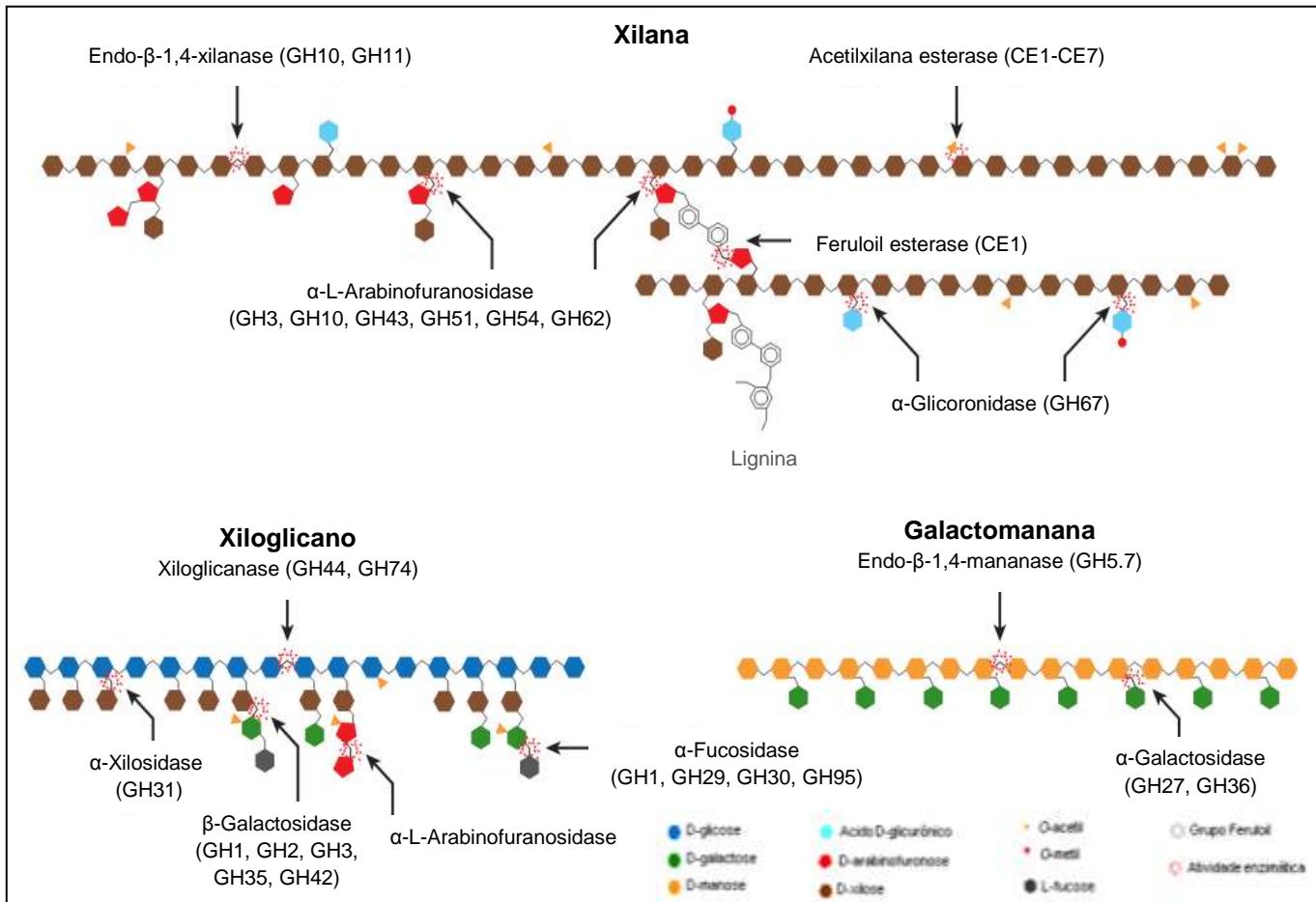
podem se tornar o maior volume de enzima industrial, se o etanol obtido de biomassa lignocelulósica por via enzimática tornar-se um importante combustível para transporte (Singhania *et al.*, 2010).

As celulases são preferencialmente produzidas a partir de fungos basidiomicetos decompositores de madeira como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsute*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Agaricus bisporus*, *Volvariell volvacea* e *Schizophyllum commune* (Gouvêa, 2013). No entanto, como relatado por Henrissat *et al.* (1989), as bactérias *Clostridium thermocellum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Bacillus* sp., *Cellulomona fimi*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Cryptococcus albidus* produzem também celulases em níveis elevados. Fungos filamentosos como *T. reesei* (Martinez *et al.*, 2008) e em menor extensão *Aspergillus* sp. (Martens-Uzunova & Schaap, 2009), também são relatados como produtores de celulases. Recentemente, sistemas celulolíticos de espécies de *Penicillium* tem mostrado potencial em aumentar a sacarificação de lignocelulosas (Marjamaa *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Características e aplicações das hemicelulases**

A degradação completa da hemicelulose necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbianas específicas (Figura 6), como as xilanases, que são glicosidases responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose) e apresentam massa molecular entre 8 a 145 kDa. (Coughlan & Hazlewood, 1993).

A principal enzima na despolimerização da xilana é a endo- $\beta$ -1,4-xilanases (GH10, GH11), que clivam aleatoriamente o esqueleto de arabinoxilana, produzindo principalmente oligossacarídeos de xilose (Coughlan & Hazlewood, 1993). As xilanases são produzidas por diversos organismos, tais como bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes. Fungos filamentosos produtores de xilanases secretam maiores quantidades de enzima com relação a bactérias e leveduras. Ainda, as xilanases fúngicas podem ser produzidas associadas às celulases (Dekker & Richards, 1976; Sunna & Antranikian, 1997; Liu *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2001).



**Figura 6.** Mecanismo de ação de enzimas que atuam na degradação da hemicelulose (Cantarel *et al.*, 2009; van den Brink & de Vries, 2011; Glass *et al.*, 2013).

As  $\beta$ -1,4-xilosidases de fungos pertencem às famílias GH10 e 11 (Polizeli *et al.*, 2005). Os dois grupos de endoxilanases diferem um do outro na especificidade do substrato (Biely *et al.*, 1997). A família GH10 apresenta uma maior versatilidade catalítica do que as endoxilanases da família GH11, sendo capazes de hidrolisar xilan altamente mais ramificadas, de forma mais eficiente. Os xiloooligossacáideos são degradados pela  $\beta$ -xilosidase. Muitas  $\beta$ -xilosidases fúngicas pertencem à família GH3, mas muitas  $\beta$ -xilosidases putativas são atribuídas à família GH43, como por exemplo, em *Penicillium herquei* e *Aspergillus oryzae*. A xiloglucanase, pertence às famílias GH12 e 74. As endomananas, envolvidas na degradação dos polissacáideos mananas, pertencem às famílias GH5 e 26. Entretanto, as endomananas fúngicas são predominantemente presentes na família GH5. Como muitas outras enzimas de carboidratos ativas, algumas endomananas possuem um módulo de ligação ao carboidrato (chamado CBM1) o qual promove a associação da enzima com o substrato (Pham *et al.*, 2010). A liberação da manobiose e manotriose é realizada ainda pela enzima  $\beta$ -1,4-manosidase pertencente à família GH2 (Ademark *et al.*, 2001).

Para a completa degradação da hemicelulose, todas as suas ramificações necessitam ser degradadas. Isso requer pelo menos nove diferentes enzimas divididas ao longo de pelo menos doze famílias GHs, entre elas as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (GH3, GH10, GH43, GH51, GH54 e GH62), e quatro famílias CE, como por exemplo, as acetilxilana esterases (CE1-CE7) e feruloil esterases (CE1). As ramificações encontradas geralmente são compostas por L-arabinose, D-xilose, L-fucose, D-galactose, ácido D-glucorônico, resíduos acetil e os ácidos  $p$ -cumárico e ferúlico (Gouvêa, 2013).

As endo- $\beta$ -1,4-xilanases constituem um grupo de enzimas com aplicações industriais, particularmente na indústria de alimentos para animais, mas também são utilizadas nas indústrias de polpa e papel (biobranqueamento) e processamento de alimentos (Xiong *et al.*, 2005). As formulações com xilanases para rações animais são utilizadas, principalmente, para liberar nutrientes que não foram degradados ou liberar nutrientes que permaneceram bloqueados por fibras. Isto resulta na diminuição da viscosidade, possibilitando uma utilização mais eficiente do alimento (Xiong *et al.*, 2004). Também são utilizadas para melhorar a eficiência na produção de silagens (Kulkarni *et al.*, 1999).

Na indústria de polpa e papel, as xilanases são empregadas em formulações livres de celulases para hidrolisar a xilana presente na polpa e facilitar a extração da lignina. Ainda, a utilização destas enzimas reduz o consumo de reagentes tóxicos (cloro e peróxido de hidrogênio) requeridos no processo de branqueamento da polpa (Madlala *et al.*, 2001), além de possibilitar a obtenção de um papel com maior resistência (Damaso *et al.*, 2002).

No processamento de alimentos, as xilanases são empregadas na clarificação de sucos e vinhos, em processos de maceração de vegetais, na extração de aromas e pigmentos, óleos vegetais e amido (Biely, 1985; McCleary, 1986; Bhat, 2000), além de serem empregadas na indústria de panificação para melhorar a qualidade dos produtos (Collins *et al.*, 2006).

Com a crescente pesquisa na área de biocombustíveis, as xilanases vêm sendo empregadas na conversão de biomassa renovável em combustíveis (Liu *et al.*, 2013; Karnaouri *et al.*, 2014).

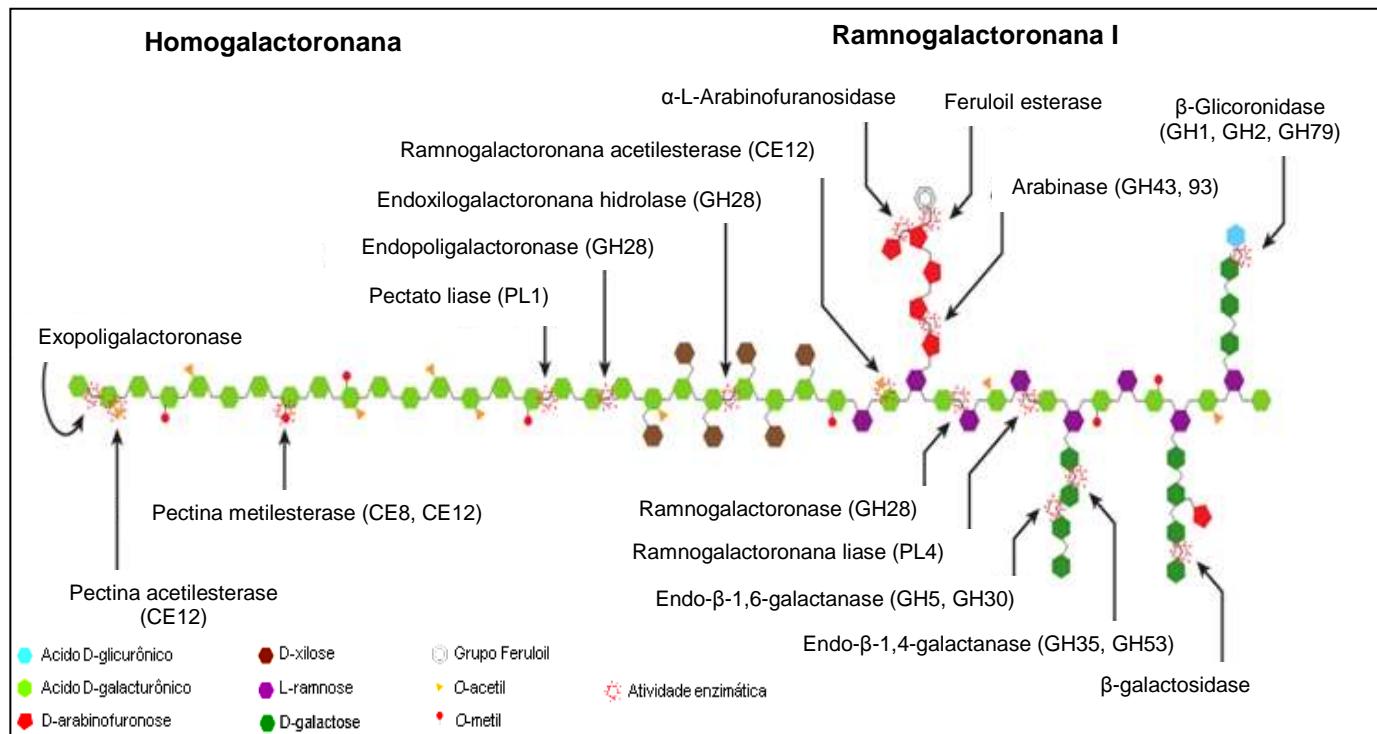
#### **2.4.3 Características e aplicações das pectinases**

A degradação das ramificações da pectina requer glicosil hidrolases e polissacarídeos liases. A grande parte das glicosil hidrolases fúngicas envolvidas na degradação da ramificação da pectina pertence à família GH28. Essas enzimas podem ser divididas em grupos de acordo com a região específica em que elas atuam: endo e exo-poligalacturonase (GH28) clivam a ramificação de regiões lineares, enquanto que mais intrínseco, as regiões

ramificadas são atacadas pelas enzimas endo e exo-ramnogalacturonase (GH28), xilogalacturonase (GH28),  $\alpha$ -raminosidases (GH78), glicuronil hidrolases insaturada (GH88) e ramnogalacturonona hidrolases insaturadas (GH105). Endo e exo-poligalacturonases da família GH28 em geral clivam as ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas entre os ácidos  $\alpha$ -galacturônico. Outro importante grupo da família GH28 são as ramnogalacturonona hidrolases, as quais estão empregadas tanto em mecanismos endo e exolítico para clivagem das pontes  $\alpha$ -1,2-glicosídico formadas entre ácido D-galacturônico e resíduos de L-raminose (Kodof *et al.*, 1994).

Pectina e pectato liases clivam, via o mecanismo de  $\beta$ -eliminação, a ligação  $\alpha$ -1,4 dos resíduos de ácido galacturônico dentro das regiões lineares da pectina. Atualmente, todas as pectinas liases pertencem à família PL1, PL3 e PL9. As estruturas xilogacturona e ramnogalacturonona também requerem enzimas acessórias para remover as cadeias laterais e promover o acesso para as enzimas pectinolíticas que hidrolisam a cadeia principal. Algumas delas como  $\alpha$ -arabinofuranosidases (GH51 e GH54),  $\beta$ -galactosidase (GH2 e GH35) e  $\beta$ -xilosidases (GH3 e GH43) também são necessárias para degradação da hemicelulose, enquanto que endoarabinase (GH43), exoarabinases (GH93),  $\beta$ -endogalactanases (GH53) e esterases (CE8, CE12 e CE13) são específicas para degradação da pectina (Gouvêa 2013).

Na Figura 7 é apresentado um complexo de enzimas pectinolíticas envolvidas na degradação de estruturas pécticas.



**Figura 7.** Ação de diferentes enzimas sobre estruturas que formam a pectina (Cantarel *et al.*, 2009; van den Brink & de Vries, 2011; Glass *et al.*, 2013).

As pectinases são enzimas empregadas em grande proporção em diversos segmentos industriais. Sua utilização em escala comercial iniciou-se a partir de 1930 para a preparação de sucos e vinhos. Algumas das aplicações destas enzimas nas indústrias de alimentos incluem amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, indústrias de papel e tecidos, de café e de chás, tratamento de resíduos vegetais, nutrição animal, enriquecimento proteico de alimentos infantis e extração de óleos, entre outras (Santi, 2005).

As pectinases, associadas com outras enzimas hidrolíticas como celulases e xilanases, vêm sendo estudadas visando a aplicação na extração de diferentes óleos vegetais, como óleo de palmeira, de oliva, de soja e de dendê (Kashyap *et al.*, 2001). Outrossim, visando a produção de etanol 2G, a pectina presente na biomassa lignocelulósica também precisa ser hidrolisada, sendo este mecanismo de degradação realizado por pectinases.

#### **2.4.4 Características e aplicações das ligninases**

Diferentes espécies de fungos secretam diferentes enzimas extracelulares que catalisam reações que levam a degradação da lignina. As mais importantes são as ligninas peroxidases, manganês peroxidase e a lacase, mas algumas outras enzimas como as celobioses quinona oxidoredutase, celobiose desidrogenase, glioalato oxidase, glicose oxidase, álcool veratrílico oxidase e algumas esterases podem participar do complexo processo natural de decomposição da biomassa lignocelulósica (Call *et al.*, 1997).

Fungos de decomposição branca são bem conhecidos pela habilidade de produzir enzimas extracelulares oxidativas que iniciam um processo de despolimerização ligninolítica. Esta capacidade permite estender seu uso para uma série de aplicações biotecnológicas, baseadas na degradação das estruturas de diversos compostos aromáticos (Mielgo *et al.*, 2001). Vários microrganismos produzem enzimas ligninolíticas, entre estes, os gêneros *Pleurotus* e *Trametes* são os mais amplamente estudados (Majeau *et al.*, 2010, *apud* Bettin, 2010).

Os processos de obtenção e clarificação de polpas celulósicas e de papel geram resíduos altamente tóxicos como cloroligninas, clorofenóis e outros organoclorados de baixo peso molecular, além de substâncias derivadas da lignina que dão cor escura aos efluentes. Ligninases como a lignina peroxidase e manganês peroxidase podem promover a degradação desses compostos e remover a cor se aplicadas ao tratamento dos resíduos (Bhat, 2000).

Fungos ligninolíticos são capazes de degradar aerobicamente uma grande variedade de poluentes orgânicos recalcitrantes, incluindo vários tipos de corantes como azotrifenilmetano, antraquinonona, ftalocianina e corantes heterocíclicos, assim como outros efluentes industriais (Novotný *et al.*, 2001).

As aplicações das ligninases não se restringem à degradação de compostos recalcitrantes. A implantação de genes de *Trametes versicolor* em *Saccharomyces cerevisiae*, permite que a levedura produza lacase, o que aumenta sua resistência a inibidores fenólicos na hidrólise lignocelulósica. Os resultados de um estudo detalhado deste sistema mostram que, os compostos fenólicos são um importante inibidor da fermentação, e que é vantajoso o uso de linhagens de leveduras que expressam lacase na produção de etanol a partir de compostos lignocelulósicos (Larsson *et al.*, 2001). Com esta finalidade, a lacase é utilizada na indústria vinícola, sendo usada como clarificante de vinhos ao remover fenóis de suco de uvas brancas (Carvalho, 2005).

## 2.5 Mecanismos de indução de celulases fúngicas

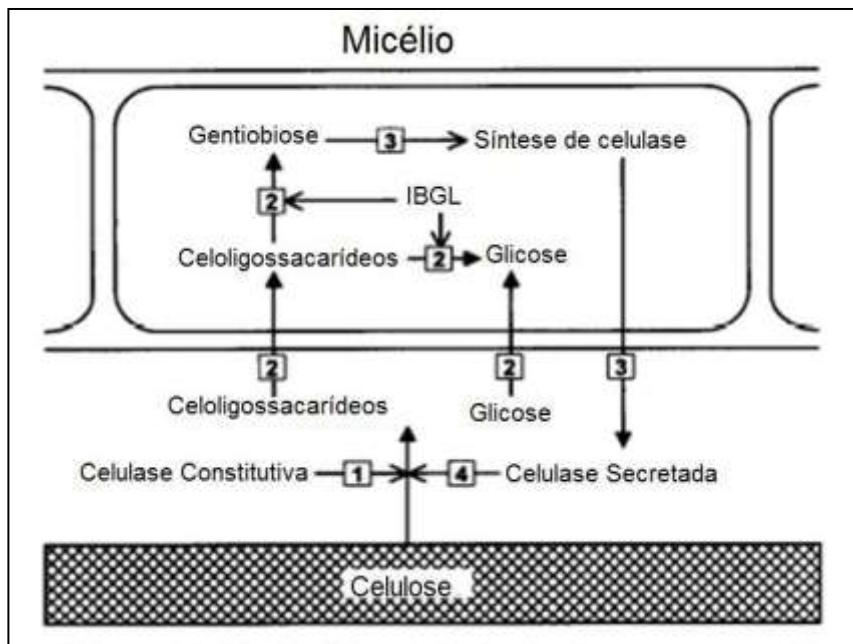
As celulases fúngicas são produzidas apenas na presença de celulose (Mandels & Reese, 1957). Entretanto, a celulose não induz diretamente a produção das enzimas, por ser um açúcar insolúvel. A indução só é possível a partir da ação de celulases basais, que degradam a celulose a celooligossacarídeos solúveis. Estes, por sua vez, conseguem entrar na célula fúngica desencadeando a indução (Gong & Tsao, 1979).

A celobiose é o menor celooligossacarídeo com ligações  $\beta$ -1,4 e sua capacidade de induzir as celulases já foi verificada por vários pesquisadores. A celobiose é um indutor encontrado na maioria dos fungos e provém da hidrólise da celulose por celulases constitutivas (Gong & Tsao, 1979). A soforose, dissacarídeo de glicose com ligações  $\beta$ -1,2, pode induzir 2500 vezes mais a expressão das celulases que a celobiose em *T. reesei* (Mandels *et al.*, 1962). A gentiobiose, dissacarídeo de glicose com ligações  $\beta$ -1,6, induz 50 vezes mais celulases em *Penicillium purpurogenum* (Kurasawa *et al.*, 1992), entretanto, tal indução só é possível apenas na presença de um inibidor de  $\beta$ -glicosidases (Niwa *et al.*, 1970).

No entanto, a soforose e a gentiobiose não compõem a celulose, são açúcares raros na natureza e por isso devem ser formados por um processo conhecido como transglicosilação. Neste processo, as  $\beta$ -glicosidases convertem celooligossacarídeos em soforose ou gentiobiose (Vaheri *et al.*, 1979; Kurasawa *et al.*, 1992).

Um modelo de indução proposto para celulases de *P. purpurogenum* pode ser observado na Figura 8. No passo 1, celulases basais degradam a celulose em

celooligossacarídeos e glicose. Em seguida, no passo 2, os dissacarídeos entram na célula e a glicose é assimilada como fonte de carbono. A  $\beta$ -glicosidase intracelular converte os celooligossacarídeos em gentiobiose e mais glicose. No passo 3, a gentiobiose induz as celulases e estas são secretadas para fora da célula. Por fim, no passo 4, as celulases secretadas degradam mais celulose em celooligossacarídeos e glicose, dando continuidade ao ciclo até que a celulose é esgotada (Suto & Tomita, 2001).



**Figura 8.** Modelo de indução de celulases em *Penicillium purpurogenum*. Os números de 1 a 4 correspondem aos processos de indução. Abreviação: IBGL:  $\beta$ -glicosidase intracelular (Suto & Tomita, 2001).

## 2.6 Fontes de carbono para a produção de celulases

Além da linhagem, a produção de celulases é influenciada por diversos fatores, como a concentração do substrato, condições de crescimento, aeração, temperatura e pH. Outro fator importante para obterem-se altos níveis de enzimas é o emprego de linhagens geneticamente modificadas que apresentem desrepressão aos açúcares (Dillon, 2006; Dillon *et al.*, 2011), bem como a fonte de carbono utilizada.

As celulases são enzimas induzidas e várias fontes de carbono foram estudadas para identificar os substratos de maior efeito indutor desde Mandels & Reese (1957) e Mandels, (1975) e estudos mais recentes podem ser encontrados na literatura (Tabela 2). A celulose é reconhecida como o melhor indutor do complexo enzimático das celulases, sendo a lactose e a soforose os outros indutores mais importantes (Mandels *et al.*, 1962; Mandels, 1975; Harikrishna *et al.*, 2000). Ryu & Mandels (1980) constataram que a indução do complexo

enzimático pela celulose, celobiose e lactose, só é possível quando estes substratos estão em elevadas concentrações no meio de cultivo.

A natureza do substrato é muito importante para o crescimento do microrganismo celulolítico. Mandels & Weber (1969) estudaram a indução de celulases em *Trichoderma viride*, cultivando o fungo em vários substratos. Estes autores observaram que fontes insolúveis de celulose, como *Solka Floc®* (polpa de celulose), algodão e papel filtro, são todas indutoras de celulases, como também os dissacarídeos solúveis, lactose e celobiose. A soforose (2-O- $\beta$ -D-glicopiranósil-D-glicose) é um dissacarídeo indutor que proporciona elevada atividade celulolítica, enquanto o amido e a glicose não atuam como indutores dessas enzimas.

Dillon *et al.* (2011) verificaram que a produção de celulases por *P. echinulatum*, linhagem S1M29 não é inibida quando o meio de cultivo apresenta na sua composição, além de celulose, a sacarose como fonte de carbono. O trabalho também mostrou que um meio formulado com apenas 0,5% (m/v) de sacarose permite obter um complexo celulolítico favorável para a hidrólise da celulose, com maiores atividades de FPA e endoglicanases, quando comparado a um meio de 1% (m/v) de sacarose. No entanto, verificaram-se maiores atividades de  $\beta$ -glicosidases no meio de cultivo contendo 1% (m/v) de sacarose.

Meios de crescimento de *T. reesei* com concentrações de glicose superiores a 0,1% (m/v), inibem a secreção de celulases por repressão catabólica (Abrahão-Neto, 1995). No entanto, Domingues *et al.* (2001) verificaram que concentração de glicose entre 0,04% e 0,06% (m/v) presentes no meio de cultivo já são suficientes para inibir a ação das celulases. A repressão catabólica também pode ocorrer pela celobiose, dissacarídeo produto da degradação da celulose visto que é rapidamente hidrolisado. Zaldivar *et al.* (2001) indicaram que o complexo celulásico de *T. reesei* é deficiente em celobiases, o que causa acumulação da celobiose e posterior limitação da síntese e atividade enzimática pela inibição pelo produto.

A utilização de glicerol como substrato para produção de enzimas e o desenvolvimento de novos produtos com valor agregado, como na indústria de alimentos, bebidas e cosméticos, torna-se estratégico (Klepacova *et al.*, 2003), uma vez que a crescente produção de biodiesel – em todo o mundo e em especial no Brasil – deve levar a uma produção de uma grande quantidade de glicerol no mercado. Ilmen *et al.* (1997) identificaram que a fonte de carbono glicerol é considerada “neutra”, não apresentando comportamento indutor ou repressor, mas que, quando utilizada em presença de celobiose, soforose ou celulose, induz a síntese de celulases. Zampieri *et al.* (2013) verificaram que a utilização de glicerol como fonte de carbono possibilitou a produção de endoglicanases.

Na Tabela 2 são dispostos dados de atividade enzimática sobre papel de filtro (FPA) de diferentes microrganismos, decorrentes da produção enzimática em diferentes substratos e diferentes concentrações. Os dados foram obtidos em cultivos submersos, empregando biorreatores com agitação mecânica e ou frascos mantidos sob agitação.

**Tabela 2.** Comparaçao na produção de celulases empregando diferentes microrganismos e substratos (adaptado de Reis, 2011).

Microrganismo	Substrato	Magnitude	FPA (UI/mL)	Referência
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Palha de arroz	Frascos	10,4	Hideno <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	Palha de trigo	Frascos	3,2	Singh <i>et al.</i> (2009)
<i>Neurospora crassa</i>	Palha de trigo	Frascos	1,33	Romero <i>et al.</i> (1999)
<i>Penicillium brasiliense</i>	<i>Solka Floc 200®</i> (celulose)	Biorreator	0,75	Jorgensen <i>et al.</i> (2005)
<i>Penicillium citrinum</i>	Farelo de trigo	Frascos	1,72	Dutta <i>et al.</i> (2008)
<i>P. echinulatum</i> 9A02S1	Bagaço de cana-de-açúcar	Frascos	0,95	Camassola <i>et al.</i> (2009)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	<i>Celuflok E®</i> (celulose)	Frascos	2,0	Dillon <i>et al.</i> (2011)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	<i>Celuflok E®</i> (celulose)	Biorreator	0,9	Reis <i>et al.</i> (2013)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	<i>Celuflok E®</i> (celulose)	Biorreator	8,3	Reis <i>et al.</i> (2014)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	<i>Celuflok E®</i> (celulose)	Frascos	0,8	Novelo <i>et al.</i> (2014)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	Bagaço de cana-de-açúcar	Frascos	0,7	Schneider <i>et al.</i> (2014)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Frascos	0,55	Adsul <i>et al.</i> (2004)
<i>Penicillium occitanis</i>	Polpa de papel	Biorreator	23,0	Belghith <i>et al.</i> (2001)
<i>Penicillium persicinum</i>	<i>Solka Floc 200®</i> (celulose)	Biorreator	0,80	Jorgensen <i>et al.</i> (2005)
<i>Penicillium pinophilum</i>	<i>Solka Floc 200®</i> (celulose)	Biorreator	0,28	Jorgensen <i>et al.</i> (2005)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Salgueiro tratado a vapor	Biorreator	2,80	Reczey <i>et al.</i> (1996)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	<i>Solka Floc 200®</i> (celulose)	Biorreator	4,65	Velkovska <i>et al.</i> (1997)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Lactose/glicose	Biorreator	4,50	Domingues <i>et al.</i> (2001)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	<i>Solka Floc 200®</i> (celulose)	Frascos	1,50	Juhász <i>et al.</i> (2004)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Esterco bovino	Frascos	1,72	Wen <i>et al.</i> (2005)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Resíduos de papelão	Biorreator	2,27	Szijarto <i>et al.</i> (2004)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Resíduo fermentação milho	Biorreator	1,90	Ximenes <i>et al.</i> (2007)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Palha de arroz	Frascos	1,07	Sun <i>et al.</i> (2008)
<i>T. reesei</i> ZU-02	Resíduo sabugo de milho	Biorreator	5,48	Liming & Xueliang (2004)
<i>Trichoderma viride</i>	Celulose	Frascos	4,95	Mandels <i>et al.</i> (1971)
<i>T. viride</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Frascos	0,88	Adsul <i>et al.</i> (2004)

## 2.7 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos abrangem um grupo variado de seres multicelulares, eucarióticos simples com genomas compactos e estão amplamente distribuídos na natureza. Muitas espécies são diretamente relevantes para os seres humanos e as atividades humanas, com algumas espécies desempenhando papéis importantes na indústria, agricultura e medicina. Por exemplo, os fungos filamentosos são envolvidos na produção de metabólitos primários e secundários, incluindo ácidos orgânicos, enzimas, exopolissacarídeos, antibióticos, entre outros (Meyer, 2008; Gutiérrez-Correa *et al.*, 2012.). Além disso, várias espécies se tornaram organismos modelo para a compreensão dos processos biológicos básicos. Além de muitas espécies serem utilizadas na indústria biotecnológica e/ou farmacêutica, muitos fungos filamentosos são também patogênicos em plantas e animais, incluindo os seres humanos (Fisher *et al.*, 2012).

Na indústria biotecnológica, os fungos filamentosos são utilizados para produzir uma vasta variedade de produtos que variam de terapêuticas humanas (por exemplo, agentes bacterianos e antifúngicos) produtos químicos especiais (por exemplo, enzimas comerciais, ácidos orgânicos), os quais representam juntos bilhões de dólares em vendas anuais. Apenas uma classe de compostos, as estatinas – utilizadas no tratamento de colesterol alto – representa um mercado de quase US\$ 15 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos (Kim *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, devido a redução da oferta de petróleo e da necessidade de reduzir a emissão de carbono, impulsionou-se a busca por inovação e métodos eficazes para a produção de biocombustíveis a partir da biomassa lignocelulósica através do uso de fungos filamentosos produtores de enzimas lignocelulolíticas (Valencia & Chambergo, 2013).

### 2.7.1 Linhagens de *Penicillium echinulatum*

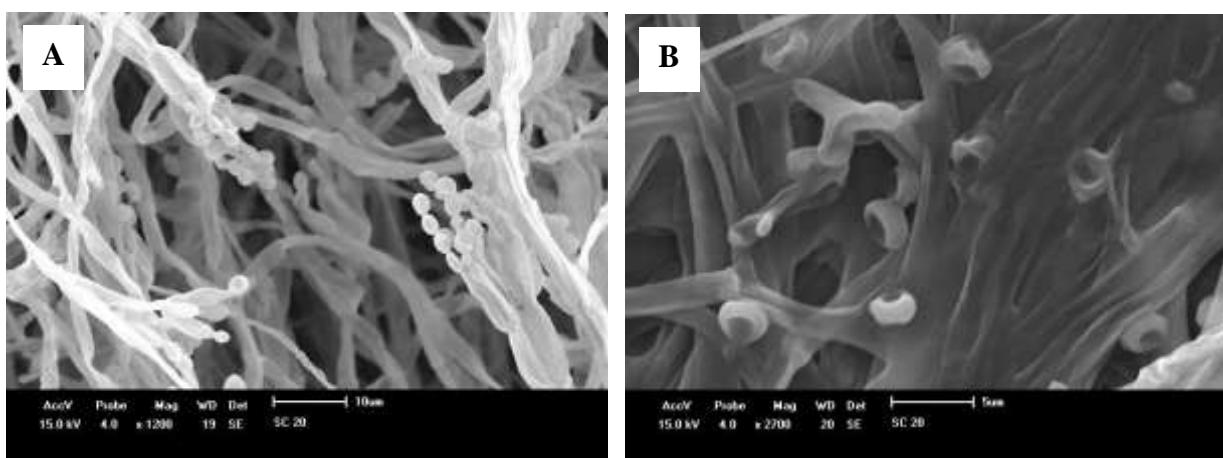
*Penicillium echinulatum* (Figura 9) está entre os microrganismos com grande potencial para a produção de celulases (Dillon *et al.*, 1999; Dillon *et al.*, 2006; Dillon *et al.* 2011). As linhagens mutantes utilizadas em estudos para a produção de celulases são provenientes da linhagem selvagem denominada 2HH isolada de larvas do coleóptero *Anobium punctatum* (Carrau *et al.*, 1981).

A linhagem mutante 9A02S1 de *P. echinulatum* foi obtida a partir da linhagem 2HH, após várias etapas de mutagênese, caracterizando-se por ser um mutante parcialmente despremido à glicose (Dillon *et al.*, 2006). Este microrganismo está depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942.

Mutantes selecionados, como é o caso da linhagem 9A02S1, são capazes de secretar celulases com atividade de papel filtro maior do que 2 UI/mL, empregando 1% (m/v) de celulose como fonte de carbono, e com valores superiores a 30 U/g massa seca em fermentação no estado sólido, usando bagaço de cana-de-açúcar (Camassola, 2007; Camassola & Dillon, 2010).

A linhagem mutante S1M29 de *P. echinulatum* foi obtida a partir da linhagem 9A02S1, por meio de mutagênese empregando peróxido de hidrogênio e seleção dos mutantes em meio suplementado com 2-deoxiglicose (Dillon *et al.*, 2011).

A importância do complexo enzimático de *P. echinulatum* deve-se também ao fato deste apresentar uma proporção equilibrada de atividades de FPA e  $\beta$ -glicosidase, fato relevante para a hidrólise da celulose (Martins *et al.*, 2008). Adicionalmente, FPA e  $\beta$ -glicosidases de *P. echinulatum* são importantes para hidrólise de celulose, pois as celulases produzidas apresentam estabilidade térmica entre 50 °C e 55 °C, respectivamente (Camassola *et al.*, 2004).



**Figura 9.** Microscopia eletrônica de varredura de *Penicillium echinulatum* em cultivo sólido. A – aumento de 1200 $\times$ , B – aumento de 2700 $\times$  (Fonte: Camassola, 2008).

Reis *et al.* (2014) estudaram o efeito do pH na produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em biorreator de bancada e descobriram que valores mais altos de pH (5.5 – 7.0) favoreceram atividades de endoglicanases, xilanases e FPA, enquanto que valores mais baixos de pH (4.0 – 6.0) favoreceram a atividade de  $\beta$ -glicosidases. Reis *et al.* (2013) também avaliaram a produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em batelada e batelada alimentada e concluíram que esta linhagem produz níveis elevados de celulases e xilanases em biorreator, em cultivo sob batelada alimentada (Tabela 2).

Novello *et al.* (2014), avaliaram a indução de enzimas com xilose em cultivos com diferentes linhagens de *P. echinulatum* (selvagem 2HH; mutantes 9A02S1 e S1M29), concluindo que a xilose atua como um indutor para a produção de xilanases e celulases, especialmente endoglicanases. Os autores também descrevem maiores títulos enzimáticos quando a linhagem mutante S1M29 é empregada.

Schneider *et al.* (2014) estudaram o efeito de seis diferentes fontes de carbono sobre a morfogênese e produção enzimática da linhagem S1M29 de *P. echinulatum*. Entre as seis fontes de carbono estudadas, celulose e bagaço de cana-de-açúcar foram as mais adequadas para FPA, endoglicanases, xilanases e  $\beta$ -glucosidases. No que se refere à morfologia de crescimento de *P. echinulatum*, observou-se maiores atividades enzimáticas quando o micélio crescia numa forma dispersa, correlação possivelmente explicada devido a uma maior interação entre o substrato e as hifas.

Menegol *et al.* (2014a e 2014b) realizaram estudos de hidrólise enzimática de capim-elefante empregando a linhagem mutante 9A02S1 de *P. echinulatum* e verificaram que o pré-tratamento com hidróxido de sódio foi o que proporcionou as maiores liberações de açúcares redutores. Os autores também verificaram que o uso de surfacantes como Triton-X100® e Tween-80® durante a hidrólise enzimática de capim-elefante, favoreceram um aumento na liberação de açúcares redutores quando comparados com o controle sem a adição de surfactantes. Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que menores granulometrias do substrato capim-elefante (0,075 mm – 0,152 mm) estavam relacionados com maiores liberações de açúcares redutores.

Zampieri *et al.* (2013) avaliaram e validaram genes de referência em *P. echinulatum* S1M29 para permitir estudos de expressão gênica usando PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e verificaram que  $\beta$ -actina (*actb*) foi o gene de referência mais estável expresso em *P. echinulatum*.

Recentemente, o sequenciamento do fungo *P. echinulatum* foi realizado. De acordo com resultados ainda não publicados já é possível ter uma visão geral sobre o seu genoma. *P. echinulatum* possui um genoma correspondente a 30,5 Mb, 8500 genes já foram mapeados, sendo 174 pertencentes à família das GHs e 615 proteínas secretadas preditas (dados não publicados).

## 2.8 Genômica de linhagens fúngicas produtoras de enzimas

Com o rápido desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de DNA, as sequências genômicas completas de mais de 100 fungos estão disponíveis. A pesquisa atual em fungos

filamentosos destaca a contribuição significativa da era genômica e reconhece que as novas abordagens avançadas poderão analisar com eficiência os fungos através da aplicação da genômica funcional e, sem dúvida contribuir para a compreensão e utilização de fungos filamentosos (Jiang *et al.*, 2013).

A sequência do genoma de *T. reesei*, linhagem selvagem QM6a, foi relatada em 2008 (Martinez *et al.*, 2008). O resultado deste trabalho tem facilitado os estudos dos sistemas biológicos deste fungo e verificou-se que *T. reesei* possui relativamente menos genes que codificam enzimas lignocelulolíticas do que muitos fungos sequenciados, com exceção de algumas hemicelulases (Kubicek, 2013).

Genes que codificam celobiose desidrogenases, endo- $\beta$ -1,4-galactanases, feruloil esterases, tanases, pectato liases e pectina esterases não foram encontrados no genoma de *T. reesei*, e podem necessitar serem introduzidos a partir de outras espécies para melhorar a eficácia de seu sistema enzimático. A sequência genômica de *Acremonium cellulolyticus* (utilizado como um produtor de celulase por Meiji Seika Pharma Co., no Japão) e *Myceliophthora thermophila* (usada por Dyadic Netherlands) também foram sequenciados (Hinz *et al.*, 2009; Kanna *et al.*, 2011), embora os dados ainda não estão publicamente disponíveis até o presente momento. *M. thermophila* foi relatada contendo o triplo de celulose monooxigenases e o quádruplo de proteínas contendo domínio de ligação de celulose quando comparado a *T. reesei*, o que contribui para o melhor desempenho de suas enzimas na hidrólise da lignocelulose (Visser *et al.*, 2011).

O genoma de *Penicillium decumbens*, fungo utilizado na indústria de celulase da China, também já foi sequenciado (Chen *et al.*, 2011). De acordo com o método de screening usando holocelulose como fonte de carbono, o sistema enzimático de *P. decumbens* demonstra elevadas atividades tanto de celulase como de hemicelulase. O sistema enzimático também apresenta relativamente alta atividade de  $\beta$ -glicosidase, o que é favorável para a hidrólise de lignocelulose (Shen *et al.*, 2008). Além disso, *P. decumbens* produz grandes quantidades de enzimas lignocelulolíticas dentro de um curto período de tempo – 3 a 4 dias – (Cheng *et al.*, 2009), além de apresentar um maior número de enzimas lignocelulolíticas, especialmente hemicelulases, quando comparado ao *T. reesei* (Liu *et al.*, 2013).

A análise genômica destes fungos industriais possibilitou esclarecimentos genéticos para futuras investigações. Até o momento, não foi identificado nenhum fungo que possua todos os genes que codificam todas as enzimas lignocelulolíticas conhecidas. Se uma enzima de importância não é codificada pelo genoma de um fungo, a sua ausência pode ser confirmada por ensaio enzimática, e então a enzima pode ser suplementada por meio de

expressão heteróloga. Assim sendo, o sequenciamento de genomas ajudará a identificar enzimas lignocelulolíticas não reconhecidas (Liu *et al.*, 2013).

## 2.9 Proteômica de fungos filamentosos

A proteômica é definida como a análise sistemática do proteoma, que segundo Mark Wilkins (1994), trata-se do conjunto de proteínas expressas por um genoma, célula ou tecido em uma condição específica. A proteômica permite identificar e quantificar o número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular e prover uma análise do estado celular, ou mudanças que ocorrem durante o crescimento, desenvolvimento ou resposta a fatores ambientais, mostrando-se como uma tecnologia útil no estudo de sistemas biológicos altamente dinâmicos e complexos (Gómez-Mendoza, 2009).

Diferentes técnicas são empregadas numa análise proteômica (Ahrens *et al.*, 2010). De maneira geral, as metodologias empregadas em proteômica podem ser classificadas nos tipos *bottom-up* ou *top-down*. O primeiro, também denominado *shotgun*, inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão tríptica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massas (MS). O *topdown*, ao contrário, é um processo no qual as proteínas intactas (e não os peptídeos) são submetidas à análise por MS. As abordagens *bottom-up* (*shotgun*) possuem muitas vantagens, como sensibilidade e reproduzibilidade, mesmo para proteomas complexos como os de soro e lisados celulares. Entretanto, as respostas obtidas são fragmentos de um todo e, embora seja possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos, as modificações pós-traducionais não são reconhecidas. Além disso, um peptídeo pode ser perdido durante a cromatografia ou não gerar espectros de massas adequados (Barbosa *et al.*, 2012). Contudo, a metodologia de *shotgun* ainda é reconhecida pela sua eficiência em identificar peptídeos com precisão por MS e sequenciá-los por MS/MS. Hoje esta metodologia é, sem dúvida, a mais utilizada em trabalhos de metaproteômica (Burnum *et al.*, 2010).

Apesar de uma centena de genes que codificam enzimas lignocelulolíticas podem ser previstos em um fungo, o perfil proteômico de secretomas sob condições específicas de crescimento é necessário. Eletroforese bidimensional (2DE), Cromatografia líquida (LC) com base em tecnologias proteômicas foram utilizadas para analisar os componentes de sistemas de enzimas lignocelulolíticas de diversos fungos (Tabela 3).

Uma alta diversidade de proteínas estão presente nos proteomas de fungos filamentosos, heterogeneidade proporcionada pelo surgimento de múltiplas modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação, sulfonação, acetilação e metilação, entre outras,

**Tabela 3.** Análise proteômica de sistemas enzimáticos lignocelulolíticos produzidos por fungos ascomicetos (Liu *et al.*, 2013).

Organismo	Fonte de Carbono	Método <sup>a</sup> de separação (Proteína/Peptídeo)	Principais proteínas no secretoma <sup>b</sup>	Referência
<i>T. reesei</i> <sup>c</sup>	-	2DE	CBH, EG, BG, XYN	Fryksdale <i>et al.</i> (2002)
<i>T. reesei</i> RUT-C30, CL847	Lactose; xilose com lactose	2DE, 2DE-LC	CBH, EG, XG, BG, proteínas de ligação à celulose, CIPI, CMO, ABF	Herpoel-Gimbert <i>et al.</i> (2008)
<i>T. reesei</i> RUT-C30, linhagem modificada <sup>d</sup>	Palha de milho pré-tratada (RUT-C30)	SDS-PAGE-LC	RUT-C30: CBH, XG, EX; Spezyme CP: CBH, EG, XG, proteína ligada à celulose CIPI	Nagendran <i>et al.</i> (2009)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Xilose com ácido acético com L-arabinose com galactose; lactose	2DE, 2DE-LC	BX, CBH, PEP, XYN	Jun <i>et al.</i> (2011)
<i>T. reesei</i> QM6a, QM9414, RUT-C30, QM9114MG5	Carboximetilcelulose	SDS-PAGE-LC	AMY, CBH, EG, ABF	Adav <i>et al.</i> (2011)
<i>T. reesei</i> QM6a, RUT-C30	Celulose; palha de milho, serragem	SDS-PAGE-LC	- <sup>e</sup>	Adav <i>et al.</i> (2012)
<i>T. reesei</i> , <i>Aspergillus</i> spp., etc <sup>f</sup>	-	LC	NS22002: CBH, XYN, BG, EG; NS50010, NS50029, Novozyme 188: AMY; NS50012: PEC; NS50013, NS50053: CBH, EG; Spezyme CP, Depol 67OL: CBH, EG, XG; Xilanase: XYN, XG; Pectinase: ABF, PEC; Acelerase 100: CBH, EG, BG.	Chundawat <i>et al.</i> (2011)
<i>N. crassa</i> FGSC 2489	<i>Miscanthus</i> ; celulose	LC	CBH, EG, BG, XG, arabinase, XYN	Tian <i>et al.</i> (2009)
<i>N. crassa</i> FGSC 2489	Celulose	LC	CBH, CMO, EG, BG, celobiose desidrogenase	Phillips <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	Farelo de trigo	2DE, LC-SDS-PAGE	Cultivo em estado-sólido: AMY, PEP, BG; Cultivo líquido: AMY, XYN	Oda <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i> AB1.13	Xilose	2DE, SDS-PAGE-LC	XYN, feruloil esterase, EG	Lu <i>et al.</i> (2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	Palha de arroz	2DE-LC	CBH, BX, $\beta$ -manosidase, ABF, hemolisina	Sharma <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus nidulans</i> A78	Palha de sorgo	SDS-PAGE-LC	XYN, BG, CBH, CHI, PEP	Saykhedkar <i>et al.</i> (2012)
<i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>Ustilago maydis</i> , <i>T. reesei</i> CL847	Farelo de trigo mais maltose	SDS-PAGE-LC	<i>A. niger</i> : AMY, ABF, EX, feruloil esterase; <i>A. nidulans</i> : CHI, PEP, EX; <i>U. maydis</i> : ABF, AGA, EX, GMC oxidoredutase; <i>T. reesei</i> : CBH, EG, EX, XG, BG	Couturier <i>et al.</i> (2012)
<i>Penicillium funiculosum</i> 8/403	Celulose com milhocina	2DE, LC-SDS-PAGE, LC	CBH, XYN	Guais <i>et al.</i> (2008)
<i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1	Celulose; bagaço de cana	LC	CBH, EG, solenina, BG	Ribeiro <i>et al.</i> (2012)
<i>P. decumbens</i> 114-2	Celulose com farelo de trigo	2DE	AMY, CBH, PEP, CMO, EG, XYN	Liu <i>et al.</i> (2013)
<i>Fusarium verticillioides</i> 7600	Farelo de trigo com glicose	SDS-PAGE-LC	BG, AMY, $\alpha$ -fucosidase, AGA, BX	Ravalason <i>et al.</i> (2012)

<sup>a</sup>2DE, eletroforese bidimensional; SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio; LC, cromatografia líquida; MS, espectrometria de massas; MS/MS, espectrometria de massas em tandem.

<sup>b</sup>CBH, celobiohidrolase; EG, endo- $\beta$ -1-4-glicosidase; CMO, celulose monooxigenase; EX, endo-  $\beta$ -1-4-xilanase; XG, xiloglucanase; BX,  $\beta$ -xilosidase; ABF, arabinofuranosidase; AGA,  $\alpha$ -galactosidase; PEC, pectinase; AMY, amilase; CHI, quitinase; PEP, peptidase.

<sup>c</sup>Enzima comercial LAMINEX, da Genencor.

<sup>d</sup>Enzima comercial Spezyme CP, da Genencor.

<sup>e</sup>Apenas relações de proteínas entre diferentes amostras foram reportadas.

<sup>f</sup>Enzimas comerciais da Novozymes, Genencor e Biocatalysts.

que são extremamente importantes porque determinam a função, estabilidade e localização das proteínas (Kim *et al.*, 2007).

Os ensaios baseados em eletroforese bidimensional geralmente identificam menos proteínas do que os ensaios baseados em cromatografia líquida, mas apresentam vantagens na análise de modificações pós-traducionais em proteínas (Herpoel-Gimbert *et al.*, 2008) e na identificação de complexos multienzimáticos (Gonzalez-Vogel *et al.*, 2011). As extensas modificações pós-traducionais em proteínas secretadas tem tornado a identificação de proteínas através de impressões digitais massa peptídeo (*Fingerprint*) difícil (Oda *et al.*, 2006), e, assim, a identificação de proteínas através de espectrometria de massa *em tandem* é recomendada.

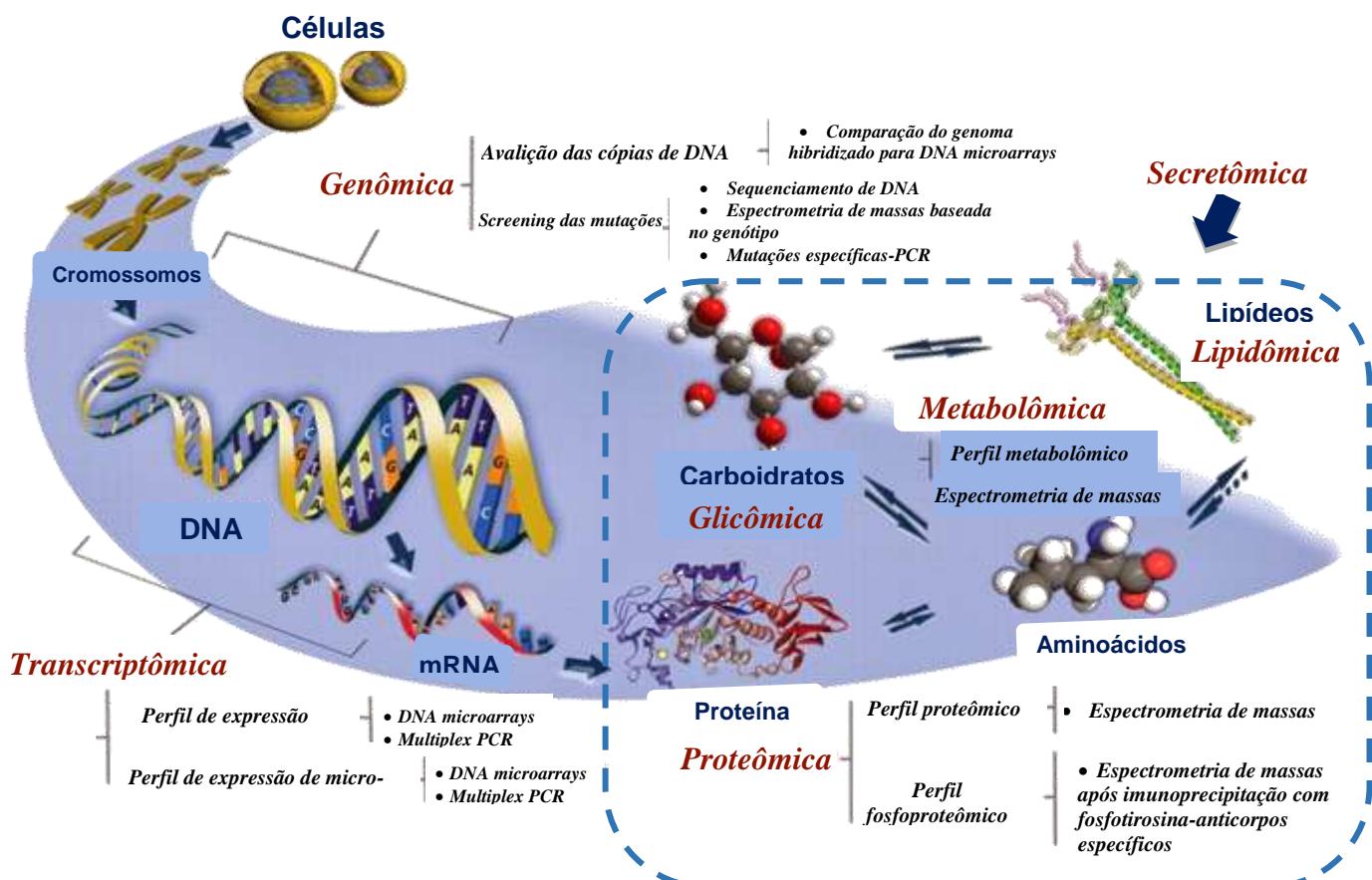
O método de espectrometria de massas (Chundawat *et al.*, 2011) e outros métodos precisos baseados na relação proteína/peptídeo (Adav *et al.*, 2012) apresentaram resultados satisfatórios na análise dos sistemas de misturas enzimáticas. Complexos enzimáticos produzidos por *T. reesei* foram frequentemente analisados nos últimos anos. Elevadas quantidades de celobiohidrolases (50% a 80%), endo- $\beta$ -1,4-glucanases (15% a 20%) e xiloglucanases (1% a 10%) têm sido detectadas nesses complexos (Chundawat *et al.*, 2011; Herpoel-Gimbert *et al.*, 2008).

## **2.10 Secretônica de fungos filamentosos**

Devido a alta complexidade dos proteomas, uma estratégia comumente adotada é o estudo de frações específicas do proteoma total, ou seja, os subproteomas (Figura 10). Como exemplos de subproteomas podem ser citados subproteomas de organelas (mitocôndria, núcleo), glicoproteomas (proteínas glicosiladas), fosfoproteomas (proteínas fosforiladas) e secretoma (conjunto de proteínas secretadas por um organismo) (Kim *et al.*, 2007).

Considerando como uma fração do proteoma total do organismo, ou seja, um subproteoma, está o secretoma, que segundo a definição dada por Tjalsma *et al.* (2000) é o conjunto de enzimas e demais proteínas secretadas por um determinado tipo celular ou por um conjunto de células, assim como a maquinaria responsável pela secreção destas proteínas.

A secreção de proteínas em fungos filamentosos tem um papel importante principalmente na nutrição dos mesmos. Muitas das proteínas e enzimas que são secretadas recebem atenção pelo potencial por serem utilizadas em processos industriais, estimulando pesquisas relacionadas à genética e mecanismos de secreção das enzimas (Gómez-Mendoza, 2009).



**Figura 10. Esquema das tecnologias ômicas, seus alvos de análise correspondente e seus respectivos métodos de estudo.** DNA (genômica) é primeiramente transcrito a mRNA (transcriptômica) e traduzido a proteínas (proteômica) que catalisa reações, originando metabólitos (metabolômica), glicoproteínas e carboidratos (glicômica) e vários lipídios (lipidômica). Ao conjunto de produtos secretados por um microrganismo dá-se o nome secretômica (adaptado de Sawyers, 2008).

Avanços na análise proteômica têm auxiliado os estudos sobre secretômica de fungos filamentosos, principalmente porque eles podem elucidar vias de secreção, bem como genes para deleção ou co-expressão, para melhorar linhagens para fins biotecnológicos. Além disso, estudos de secretômica estão sendo direcionados não somente para o entendimento do papel dos fungos filamentosos como saprófitos onipresentes na natureza, mas também como uma espécie de maquinaria celular capaz de secretar quantidades consideráveis de proteínas. No caso de fungos celulolíticos, a secretômica foca na identificação de glicosil hidrolases e componentes acessórios envolvidos na degradação de polissacarídeos da parede celular de plantas (Ribeiro *et al.*, 2012).

Os secretomas de muitas espécies de fungos foram investigados nos últimos anos. *Trichoderma reesei*, conhecido como o mais eficiente fungo produtor de celulases, teve seu secretoma revelado. Estudos envolvendo linhagens de *T. reesei* empregando diferentes fontes

de carbono (Jun *et al.*, 2011), diferentes pHs (Adav *et al.*, 2011), foram realizados. Um trabalho conduzido por Adav *et al.* (2012a), envolveu o secretoma da linhagem selvagem QM6a e o mutante RUT-C30 de *T. reesei* crescidos em meios contendo celulose, palha de trigo e serragem. Os autores concluíram que as enzimas lignocelulolíticos no secretoma de ambas as linhagens de *T. reesei* são dependentes de fontes de carbono lignocelulósicas. A classificação funcional destas proteínas quantificadas revelaram 31,3, 17,9, 13,4, 22,0, 6,3, 3,3, e 5,6% de celulases, hemicelulases, proteínas de degradação de lignina, peptidases, quitinases e fosfatas, transporte e proteínas hipotéticas, respectivamente. Nos trabalhos envolvendo *T. reesei*, entre as enzimas encontradas nos secretomas, celulases correspondem o grupo majoritário.

Silva *et al.* (2012), realizaram estudos com o secretoma de *Trichoderma harzianum* crescido em bagaço de cana, por meio de análise de *Blue native-PAGE* e a análise do secretoma revelou a ação de celulases e hemicelulases agindo como complexos multienzimáticos, o que é um tanto incomum para fungos filamentosos, já que estes normalmente secretam enzimas hidrolíticas de forma individual que agem sinergicamente na degradação de polissacarídeos. Na análise do secretoma, foram identificadas celobiohidrolases I e II, alfa-L-arabinofuranosidase, xilana- $\beta$ -1,4-xilosidase, acetilxilana esterases, cutinases, endo- $\beta$ -1,4-xilanase, solenina, proteínas putativas, entre outras.

Em estudos posteriores de Gómez-Mendoza *et al.* (2013), o secretoma de *T. harzianum* crescido em diferentes substratos provenientes da biomassa vegetal (glicose, celulose, xilana e bagaço de cana) foi analisado por meio de atividades enzimáticas e proteômica usando 2-DE/MALDI-TOF e *gel free shotgun LC-MS/MS*. Neste estudo verificou-se que maiores atividades celulolíticas e xilanolíticas foram induzidas com o bagaço de cana. A análise de amostras por LC-MS/MS identificou 626 grupos diferentes de proteínas, incluindo enzimas ativas em carboidratos e acessórias, não-catalíticas e proteínas associadas à parede celular. Embora o secretoma induzido pelo bagaço de cana tenha apresentado as maiores atividades celulolíticas e xilanolíticas, ele não correspondeu a maior complexidade do proteoma porque o secretoma induzido por carboximetilcelulose foi significativamente mais diversificado. Entre as proteínas identificadas, 73% eram exclusivas a uma condição, embora apenas 5 % estavam presentes em todas as amostras.

O gênero *Aspergillus* também é referido na literatura como produtor de enzimas relacionadas com a degradação da biomassa e a secretoma de espécies diferentes foram estudados. Um desses estudos envolve a análise proteômica de proteínas extracelulares de *Aspergillus oryzae* cultivado em farelo de trigo em regime submerso e em estado sólido (Oda

*et al.*, 2006). Proteínas diferentes foram encontradas em diferentes condições de cultivo. No estado sólido, condição em que o fungo secreta mais proteínas, a maioria delas refere-se à glicoamilases e peptidases B; no estado submerso, glicoamilases A, xilanases e quitinases foram identificados. Em ambos os cultivos,  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase foram encontrados.

*Aspergillus niger* é relatado como produtor de pectinases. Em estudo empregando diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol, sorbitol, pectina, xilana e *locust bean gum*), de aproximadamente 60 genes identificados no genoma de *A. niger* previstos para codificarem enzimas pectinolíticas, a expressão de 46 foi detectada, sendo que um grande número de enzimas que degradam pectinas tem sido experimentalmente identificado por espectrometria de massas (Tsang *et al.*, 2009).

Outro estudo, realizado com o *Aspergillus fumigatus* avaliou a produção de glicosil hidrolases em meio contendo palha de arroz (Sharma *et al.*, 2011). Este estudo identificou a presença de três  $\beta$ -glicosidases e cinco isoformas de celobiohidrolases I e endoglicanases em seu secretoma, demonstrando o potencial de produção destas enzimas, em particular  $\beta$ -glicosidase, característica reconhecida em espécies de *Aspergillus*.

Muitos estudos conduzidos com o fungo *Neurospora crassa*, outro produtor de enzimas envolvidas na degradação da parede celular, têm sido descritos Sun *et al.* (2012) revelaram que *N. crassa* é capaz de expressar uma grande variedade de enzimas que degradam a hemicelulose, e relatam que tanto xilana como celulose podem induzir a expressão de genes de hemicelulase. Um estudo recente de Benz *et al.* (2014), buscou compreender como *N. crassa* responde em função dos três principais polissacarídeos da parede celular: celulose, hemicelulose e pectina. Esta análise forneceu provas de que *N. crassa*, cultivado em meios contendo xilana, pectina ou casca de laranja em pó, usa seu complexo enzimático de forma mais eficiente para a degradação de pectina. Ainda, Phillips *et al.* (2011) verificaram que o secretoma de *N. crassa* cultivado em celulose continha grandes quantidades de celulose monooxigenases (14,6%), o que é relevante para a completa degradação de celulose.

Enzimas envolvidas na hidrólise de biomassa lignocelulósica, especialmente ligninases, foram identificadas numa análise proteômica quantitativa do basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (Adav *et al.*, 2012b) em diferentes biomassas lignocelulósicas (palha de milho, feno, serragem, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e de aparas de madeira).

Os secretomas de vários outros fungos já foram descritos sendo melhores na hidrólise lignocelulolítica quando comparados ao secretoma de *T. reesei* (Gusakov, 2011). A análise proteômica destes secretomas têm fornecido informações importantes para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos altamente eficientes para a degradação de biomassa.

Entre os secretomas estudados, Guais *et al.* (2008) caracterizaram um coquetel enzimático chamado "RavobioTM Excel" produzido por *Penicillium funiculosum* empregando diferentes técnicas de análise proteômica e foram encontradas em maiores quantidades endoglicanases, celobiohidrolases e xilanases.

Outra espécie de *Penicillium*, *P. chrysogenum*, apresenta um secretoma voltado principalmente para a produção de enzimas relevantes para a indústria de alimentos, como glicoamilases e sulfidril oxidases. No entanto, 12% de seu secretoma está envolvido na produção de enzimas de degradação de parede celular, sendo encontradas pectinases e feruloil esterases (Jami *et al.*, 2010).

*Penicillium decumbens* também teve seu secretoma estudado e foi verificado que o mesmo apresenta um sistema enzimático lignocelulolítico mais diverso que *T. reesei*, particularmente para proteínas de domínio de ligação a carboidrato e hemicelulases (Liu *et al.*, 2013).

Assim como outros do gênero *Penicillium*, um trabalho de proteômica envolvendo o fungo *Penicillium echinulatum* foi conduzido por Ribeiro *et al.* (2012). Este estudo realizado com a linhagem mutante 9A02S1 de *P. echinulatum*, revelou um perfil predominante de enzimas do complexo celulolítico (endoglicanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidases). Membros da família das glicosil hidrolases foram identificadas, incluindo endoglicanases GH5, 7, 6, 12, 17 e 61,  $\beta$ -glicosidases GH3, xilanases GH10 e GH11, bem como hemicelulases de GH43, GH62 e CE2 e pectinases de GH28.

Numerosos secretomas fúngicos com várias composições foram testados a fim de avaliar seus efeitos sinérgicos com o sistema enzimático de *T. reesei*. Se a sinergia é detectada, o sistema de enzima pode ser ainda fracionado para encontrar o(s) componente(s) sinérgico(s) ativo(s) (Liu *et al.*, 2013).

O avanço mais notável nesta área é a descoberta das celuloses monooxigenases, anteriormente classificados como GH61 - endo- $\beta$ -1,4-glicanases (Žifčáková & Baldrian, 2012). Pelo método do screening de diversos fungos celulolíticos, pesquisadores da Novozymes primeiramente verificaram que o secretoma de *Thielavia terrestris* atua sinergicamente com o sistema enzimático de *T. reesei* na hidrólise de palha de milho. Então, o

secretoma de *T. terrestris* foi separado em diferentes frações e a importante função das proteínas GH61 na sinergia foi detectada (Merino & Cherry, 2007).

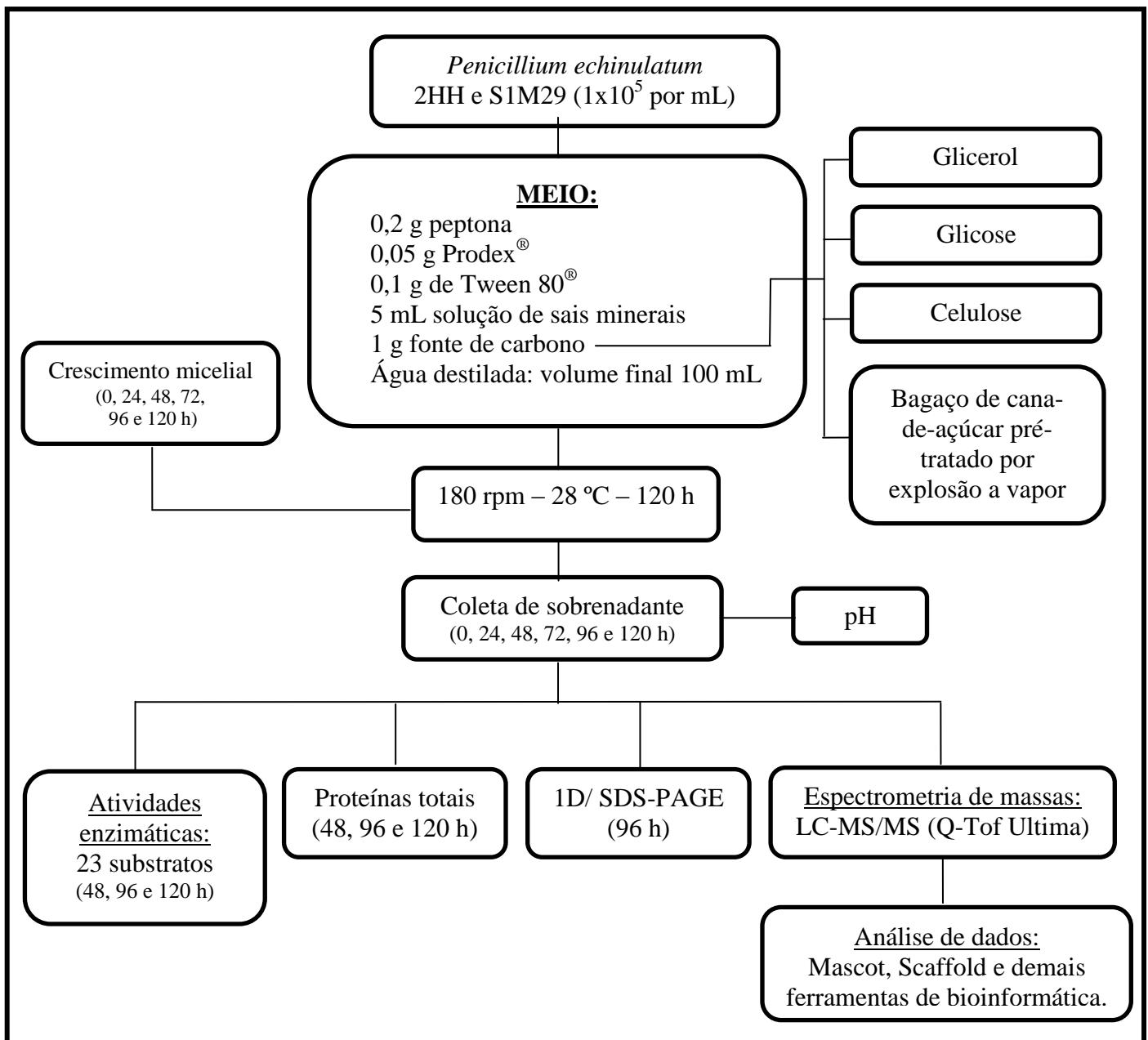
Além de *T. terrestris*, outros fungos, especialmente alguns patógenos de plantas e espécies decompositoras de madeira, têm exibido sinergia entre seus secretomas e o sistema enzimático de *T. reesei*. Ensaios enzimáticos e análise proteômica desses secretomas fornecem informações para compreender a sinergia observada. Por exemplo, o secretoma de *Fusarium verticillioides* é rico em  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e pectinases (Ravalason *et al.*, 2012), e o secretoma de *Ustilago maydis* é rico em hemicelulases e glicose-metanol-colina-oxirredutases (Couturier *et al.*, 2012). Levando em consideração que os mais sinérgicos sistemas enzimáticos são ricos em enzimas não-celulolíticas, o secretoma de *Trametes gibbosa* mostrou oito vezes mais atividade específica em celulose cristalina do que *T. reesei* (Berrin *et al.*, 2012).

A atividade sinérgica de proteínas também é afetada por glicosilação. Já foi encontrada uma glicoforma não-hidrolítica de celobiohidrolase I purificada de *P. decumbens* exibindo notável sinergia com preparações de celulase comercial na hidrólise palha de milho pré-tratados (Gao *et al.*, 2012). Entretanto, a sinergia não é observada quando as outras três glicoformas codificadas pelo mesmo gene foram testadas. Portanto, a expressão eficiente da forma necessária das proteínas sinérgicas deve ser considerada na engenharia de linhagens para o melhoramento da sinergia de sistemas lignocelulolíticos enzimáticos. Entre as possíveis estratégias de engenharia de linhagens fúngicas para aumentar sua produtividade enzimática está a engenharia da via de secreção (Liu *et al.*, 2013).

Análises do secretoma de fungos filamentosos são indispensáveis para conhecer a identidade e função do arsenal de enzimas hidrolíticas extracelulares que participam da degradação de compostos lignocelulósicos e outros biopolímeros em resposta a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, visando uma aplicação biotecnológica de tais enzimas (Bouws *et al.*, 2008).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, é descrita a metodologia empregada no presente estudo. Um fluxograma contendo os procedimentos realizados para a análise do secretoma das linhagens de *Penicillium echinulatum* empregadas é apresentado na Figura 11.



**Figura 11:** Fluxograma representando a metodologia empregada na análise do secretoma da linhagem selvagem 2HH e do mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum*.

### **3.1 Linhagens**

Para a produção de enzimas foram utilizadas a linhagem selvagem 2HH e o mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum*. As linhagens pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

### **3.2 Crescimento e manutenção de linhagens**

A linhagem selvagem 2HH e mutante S1M29 foram crescidas e mantidas em 100 mL de ágar-celulose (C-agar), consistindo de 40 mL de celulose intumescida, 10 mL de solução mineral; 0,1g proteose peptona (Oxoid L85<sup>®</sup>); 2 g de ágar e 50 mL de água destilada. As linhagens foram crescidas em tubos inclinados com C-ágar por 7 dias a 28 °C até a formação de conídios e então estocadas a 4 °C, conforme Dillon *et al.* (2006). A suspensão de celulose intumescida (2,5 g em 100 mL) foi autoclavada e, após, permaneceu sob agitação a 180 rpm por 7 dias. Esta suspensão foi armazenada a 4 °C até o momento do uso. Foi utilizada celulose *Celufllok E<sup>®</sup>* (Celufllok Celulose e Amidos Ltda, Cotia, SP).

### **3.3 Produção de enzimas**

O meio de cultivo para a produção de enzimas consistiu de 0,2 g de peptona; 0,05 g de *Prodex<sup>®</sup>*; 1 g da fonte de carbono; 0,1 g de *Tween 80<sup>®</sup>*; 5 mL da solução mineral de Mandels e Reese (1957) e água destilada para completar o volume final de 100 mL. A solução mineral de Mandels e Reese (1957) foi composta por: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4 g); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,6 g); CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,6 g); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,6 g); CaCl<sub>2</sub> (0,6 g); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1 g); MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,03 g); ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O (0,029 g); CoCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O (0,004 g). Estes sais foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada, sendo a solução autoclavada e armazenada a 4°C.

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de produção, foram inoculados com uma suspensão de conídios  $1 \times 10^5$  por mL, mantidos a 28 °C, em agitação recíproca de 180 rpm, durante 120 horas. O experimento foi realizado em triplicatas e as coletas foram realizadas a cada 24 horas. As amostras foram conservadas sob refrigeração com azida sódica 0,02% (m/v).

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na secretômica da linhagem selvagem e mutante de *P. echinulatum*, foram empregados como fonte de carbono: celulose *Celufllok E<sup>®</sup>*, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BCA), glicose (PA) e glicerol (PA).

As amostras de BCA foram obtidas na usina Vale do Rosário, Fazenda Invernada, Morro Agudo/SP. Nesta usina se utiliza descompressão súbita com descarga integral do reator. A operação é realizada em ciclos com carga de 840 kg de bagaço de cana-de-açúcar 50% umidade sem prévio tratamento. A operação utiliza vapor saturado ( $25 \text{ kg/cm}^2$ ) com injeção automática (rampa de 1 minuto), de modo que o reator opera a  $16 \text{ kg/cm}^2$  durante cerca de 7 minutos. Após este período, o reator é descarregado através de uma válvula de cunha e o BCA é enviado a um silicone, onde ocorre a expansão e coleta.

### **3.4 Determinação direta do crescimento celular**

O crescimento micelial dos meios contendo glicerol ou glicose como fontes de carbono foi determinado através da massa seca fúngica, de acordo com o método de Rapp *et al.* (1981). Para tanto, 100 mL da cultura foi centrifugada por  $9600 \times g$  por 20 minutos, após a retirada do sobrenadante, os *pellets* foram lavados três vezes com água destilada (10 mL) e após secagem a  $40^\circ\text{C}$ , até peso constante.

### **3.5 Determinação indireta do crescimento celular**

A biomassa fúngica dos meios contendo celulose ou BCA como fontes de carbono foi determinada indiretamente pela hidrólise enzimática da quitina da parede celular (Bittencourt *et al.*, 2002). Para tal metodologia, 1 mL da amostra foi centrifugada com 5 mL de água destilada por 20 minutos a  $9600 \times g$ . Este procedimento teve como objetivo remover açúcares que podem interferir na metodologia. Após a retirada do sobrenadante, foi adicionado 3 mL de tampão citrato de sódio (pH 4,8; 0,05 mol/L) e as amostras foram tratadas em ultrassom por 60 min. Em cada amostra foi adicionado 2 mL de uma solução 30% (v/v) de enzima (Viscozyme L<sup>®</sup>) diluída em tampão citrato de sódio, por 24 horas a  $45^\circ\text{C}$ . Após este período, as amostras foram fervidas por 10 minutos para inativação da enzima. As amostras foram resfriadas e centrifugadas  $9600 \times g$ .

Para a determinação do teor de N-acetyl-D-glicosamina resultante da hidrólise da quitina foi utilizada a metodologia segundo Aidoo *et al.* (1981). Em tubos contendo 1 mL da amostra hidrolisada e centrifugada foi adicionado 1 mL da solução de acetilacetona (0,75 mL de acetilacetona e completar para 25 mL de uma solução de carbonato de sódio 1,25 mol/L). As amostras foram fervidas por 20 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 6 mL de etanol e 1 mL de 4-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) (3,2 g de DMAB em 20 mL de etanol e 20 mL de HCl). Os tubos foram incubados a  $65^\circ\text{C}$  por 10 minutos e a absorbância lida a

530 nm. As concentrações de N-acetil-D-glicosamina foram obtidas a partir de curva padrão construída com concentrações de N-acetil-D-glicosamina entre 0,5 a 1 mg/mL.

### **3.6 Determinações enzimáticas**

Foram realizados ensaios de atividades enzimáticas dos sobrenadantes coletados em 48, 96 e 120 horas de cultivo, empregando-se um conjunto de 23 substratos diferentes (Megazyme - Wicklow, Ireland e Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA), a fim de mensurar celulases, hemicelulases, pectinases, amilases e esterases. Os horários de coleta foram baseados nos resultados obtidos por Schneider *et al.* (2014).

As determinações enzimáticas, bem como os experimentos referentes à secretômica de *P. echinulatum* foram realizados no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), em Campinas, SP, Brasil.

Os substratos empregados para a determinação de atividades foram os seguintes:

- **Determinação de celulases**

- Totais: FPA e  $\beta$ -glicano;
- Exoglicanases ou celobiohidrolases: Avicel® e  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo ( $\rho$ NPC);
- Endoglicanases: carboximetilcelulose, laminarina (de *Laminaria digitata*) e liquenana (de *Cetraria islandica*);
- $\beta$ -glicosidases:  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NPG).

- **Determinação de hemicelulases**

- Xilanases: xilana (de *beechwood*), rye arabinoxilana, wheat arabinoxilana, xiloglicano,  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo ( $\rho$ NPX);
- Mananases: manana, galactomanana, *locust bean gum* (de sementes de *Ceratonia siliqua*).

- **Determinação de pectinases**

- Pectinases totais: pectina (de frutas cítricas).
- Arabinanases: *larch* arabinogalactana, *debranched* arabinana, arabinana (de beterraba sacarina) e  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-arabinofuranosídeo ( $\rho$ NPA).

- **Determinação de amilases**
  - Amido de batata.
  
- **Determinação de esterases**
  - Feruloil esterases: feruloil acetato.

Todas as atividades enzimáticas foram realizadas em triplicatas. A metodologia empregada para a determinação das atividades enzimáticas foi realizada de acordo com Cota *et al.* (2011) com modificações, exceto para FPA, que foi realizada de acordo com as metodologias propostas por Ghose (1987), com as adaptações conforme Camassola & Dillon (2012). A determinação de esterases foi realizada de acordo com Koseki *et al.* (2006).

As unidades de enzimas com atividade sobre os polissacarídeos foi assumida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto. Unidades de enzimas com atividade nos substratos  $\rho$ -nitrophenyl foi assumida como a quantidade de enzimas capaz de liberar 1 µmol de  $\rho$ -nitrophenyl por minuto. Feruloil esterases foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de  $\alpha$ -naphthyl acetato por minuto.

### **3.6.1 Determinação de FPA (*Filter Paper Activity*)**

Foram utilizadas placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL). Em cada poço da placa foi adicionado 30 µL de solução enzimática e 120 µL de tampão citrato de sódio (0,05 mol/L - pH 4,8). Então, a placa foi colocada em banho a 50 °C. Logo após, foram adicionados a cada poço 5 mg de papel filtro (*Whatmann nº 1*) em tiras de 1 cm x 0,6 cm, mantendo-os por 60 minutos em banho a 50 °C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL da solução do reagente DNS (Miller, 1959) e, posteriormente, a placa foi colocada em banho a 100 °C por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de amostra em placa de poliestireno cristal de 96 poços (com volume individual de 0,4 mL) e adicionados 200 µL de água destilada sendo a absorbância medida em espectrofotômetro a 545 nm.

A determinação das atividades sobre papel filtro presentes nas amostras foi realizada através de curva de calibração construída com soluções de glicose com concentrações de 0, 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010.

### **3.6.2 Determinação de atividade sobre Avicel®, arabinana, carboximetilcelulose, debranched arabinana, galactomanana, laminarina, larch arabinogalactana, locust bean gum, pectina, wheat arabinoxilana, xiloglicano e manana**

Para a dosagem das enzimas ativas sobre os substratos citados acima foram utilizadas placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 100 µL). Em cada poço da placa, foi adicionada 46 µL de solução enzimática, 4 µL de tampão citrato de sódio 1 mol/L, pH 4,8. Então, a placa foi colocada em um termociclador a 50 °C. Logo após, foram adicionados a cada poço 50 µL da solução do respectivo substrato (0,5% m/v do substrato em água), mantidas em termociclador por 30 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL da solução do reagente DNS (Miller, 1959) e a placa foi colocada novamente no termociclador a 100 °C, por 5 minutos. A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação das atividades foi procedida tal como para FPA.

### **3.6.3 Determinação de atividades sobre liquenana e β-glicano**

Na dosagem das enzimas ativas sobre os substratos citados acima também foram utilizadas placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 100 µL). Porém, a determinação das atividades foi realizada de forma distinta para as diferentes fontes de carbono empregadas. Para as amostras contendo celulose ou BCA, em cada poço da placa, foi adicionada 10 µL de solução enzimática, 4 µL de tampão citrato de sódio 1 mol/L e 36 µL de água destilada. Para as amostras contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono, procedeu-se tal como para o item 3.6.2. Então, a placa foi colocada em um termociclador a 50 °C. Logo após, foram adicionados a cada poço 50 µL da solução do respectivo substrato (0,5% m/v do substrato em água), mantidas por 10 minutos (para celulose e BCA) e 30 minutos no termociclador (para glicose e glicerol). Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL da solução do reagente DNS (Miller, 1959) e a placa foi colocada novamente no termociclador a 100 °C, por 5 minutos. A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação das atividades sobre os substratos descritos acima foi procedida tal como para FPA.

### **3.6.4 Determinação de atividades sobre xilana e rye-arabinoxilano**

A determinação das atividades também foi realizada de forma distinta para as diferentes fontes de carbono empregadas. Somente para as amostras da linhagem mutante contendo celulose ou BCA, em cada poço da placa, foi adicionada 10 µL de solução

enzimática, 4 µL de tampão citrato de sódio 1 mol/L e 36 µL de água destilada. Para as amostras da linhagem selvagem contendo celulose ou BCA, e as amostras de ambas as linhagens crescidas em glicose ou glicerol, procedeu-se tal como para o item 3.6.2. Então, a placa foi colocada em um termociclador a 50 °C. Logo após, foram adicionados a cada poço 50 µL da solução do respectivo substrato (0,5% m/v do substrato em água), mantidas por 30 minutos no termociclador, com exceção das amostras da linhagem mutante contendo celulose ou BCA (10 minutos). Em seguida, reação foi interrompida com a adição de 100 µL da solução do reagente DNS (Miller, 1959) e a placa foi colocada novamente no termociclador a 100 °C, por 5 minutos. A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação das atividades sobre os substratos descritos acima foi procedida tal como para FPA.

### **3.6.5 Determinação de atividades sobre pNPA, pNPC, pNPG e pNPX**

Em cada poço das placas de polipropileno (com volume individual de 100 µL) foi adicionada 46 µL de solução enzimática e 4 µL de tampão citrato de sódio. Na dosagem das enzimas ativas sobre pNPG e pNPC, somente para os meios contendo celulose ou BCA como fontes de carbono, em cada poço da placa foi adicionada 20 µL de solução enzimática, 30 µL de tampão citrato de sódio 1 mol/L diluído, pH 4,8. Para os meios contendo glicose ou glicerol, bem com a dosagem das enzimas ativas sobre pNPA e pNPX, procedeu-se tal como o item 3.6.2. Então, cada placa foi colocada em um termociclador a 50 °C. Logo após, foram adicionados a cada poço 50 µL da solução do respectivo substrato (0,5% m/v do substrato em água), mantidas por 30 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL de uma solução 10% (m/v) de carbonato de sódio.

A leitura das amostras foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância de pNPA, pNPC, pNPG e pNPX a 405 nm e a determinação das atividades foi realizada através de curva de calibração construída com soluções de p-nitrofenil com concentrações de 2,0 mmol/L, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010.

### **3.6.6 Determinação de atividades sobre feruloil acetato**

Para as amostras contendo celulose ou BCA, em cada poço da placa, foi adicionada 5 µL de solução enzimática, 20 µL de tampão acetato de sódio (SAB) 100 mmol/L, pH 5,5 e 15 µL de água destilada. Para as amostras contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono, em cada poço da placa, foi adicionada 20 µL de solução enzimática e 20 µL de tampão SAB

100 mmol/L, pH 5,5. Então, foram adicionados a cada poço 10 µL do substrato (solução 50 mmol/L em Dimetilsulfóxido – DMSO), incubados a 40 °C num termociclador, por 30 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 100 µL da solução do reagente *Fast Garnet* (0,1% m/v do reagente e 15% SDS m/v em DMSO) e placa foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Por último, foi realizada a leitura, em espectrofotômetro, sendo a absorbância medida a 545 nm.

### **3.7 Determinação de proteínas solúveis totais**

Para a determinação quantitativa das proteínas solúveis no secretoma de *P. echinulatum* selvagem e mutante, foi empregado o método de Bradford (1976), utilizando Bio-Rad Protein Assay. Foi construída uma curva de calibração, utilizando-se 80 µL de soluções padrão de albumina sérica bovina (BSA) com concentrações entre 0 e 25 µg.mL<sup>-1</sup> e 20 µL do reativo de Bradford. A quantificação de proteínas das amostras do secretoma de *P. echinulatum* foi feita com 20 µL do reativo de Bradford e 80 µL de amostra. A reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e posteriormente lida em espectrofotômetro a 595 nm.

### **3.8 SDS-PAGE de proteínas totais**

De acordo com os resultados obtidos nas análises enzimáticas, as amostras de 96 horas do secretoma de *P. echinulatum* foram submetidas à análise do perfil proteico, uma vez que este período de cultivo correspondeu a maior parte dos picos enzimáticos. As amostras contendo celulose ou BCA foram realizadas em triplicatas, enquanto as amostras contendo glicose ou glicerol foram realizadas em uma replicata.

Para a determinação da massa molecular das celulases foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 0,1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel separador foi preparado a 12% (m/v), enquanto o gel empilhador foi preparado a 4% (m/v), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Padronizadas as amostras, foram aplicados 11 µg de amostra em cada canaleta do gel para a corrida eletroforética em cuba vertical *Bio Rad Mini Protean System Cell* a 110 V por aproximadamente uma hora e trinta minutos. O marcador molecular utilizado foi *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*.

A revelação das bandas do gel foi realizada com a incubação do gel durante 30 minutos em uma solução de 0,2% (m/v) de *Coomassie Brilhant Blue G 250*, 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético. Após o gel foi lavado com água destilada e imerso em

uma solução de 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético por 30 minutos. Todo o processo de revelação foi realizado sob agitação recíproca de 50 rpm, até que bandas fossem visualizadas.

### 3.9 Digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas

O processo de digestão de proteínas para análise por espectrometria de massas foi realizado em duas etapas. Primeiramente, cortaram-se as bandas do gel (cada *lane* do gel foi dividido em oito partes e, na sequência, cada parte foi cortada em pedaços ainda menores, em torno de 1 mm). A fim de remover o SDS, as bandas foram descoloridas com a adição de 0,5 mL da solução de descoloração (1mL de metanol + 50 mL ácido acético + 950 µL de água miliQ) e posteriormente incubadas por duas horas à temperatura ambiente.

Transcorridas as duas horas de incubação, a solução foi removida e foram adicionados novamente mais 0,5 mL da mesma solução e incubada por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, a solução de descoloração foi removida cuidadosamente com uma pipeta e o gel foi desidratado, adicionando-se 200 µL de acetonitrila e incubando por 5 minutos. Na sequência a acetonitrila foi removida e esta etapa foi repetida, sendo que o restante de acetonitrila foi evaporado em *speed vac*, durante 2 a 3 minutos. Então, as bandas foram reduzidas com 30 µL de uma solução de ditiotreitol (DTT) 10 mmol/L (1,5 mg de DTT em 1 mL de bicarbonato de amônio 100 mmol/L), incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente o DTT foi removido com auxílio de uma pipeta.

Em seguida, a alquilação das bandas foi feita com a adição de 30 µL da solução de iodoacetamida (IAA) 50 mmol/L (10 mg de IAA em 1 mL de bicarbonato de amônio 100 mmol/L), incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz e posteriormente, foi removida a solução de IAA. Então, as bandas foram lavadas com 100 µL de bicarbonato de amônio 100 mmol/L (158 mg de bicarbonato de amônio em 20 mL de água miliQ) por 10 minutos e, logo após, a solução foi removida.

Posteriormente, o gel foi desidratado com 200 µL de acetonitrila, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. A acetonitrila foi removida e as bandas reidratadas com 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mmol/L por 10 minutos. Na sequência, o bicarbonato de amônio foi removido e o gel foi desidratado com 200 µL de acetonitrila, incubando-o por 5 minutos a temperatura ambiente. Então, a acetonitrila foi removida e o processo repetido. O restante de acetonitrila foi evaporado em *speed vac*, durante 2 a 3 minutos.

Dando sequência ao protocolo, foram adicionados 30 µL da solução de tripsina *Promega*® (20 µg de tripsina solubilizada em 1000 µL de bicarbonato de amônio 50 mmol/L

gelado) em cada microtubo de reação com gel, para reidratar por 30 minutos em banho de gelo. Transcorrido o tempo necessário, as amostras foram homogeneizadas, o excesso de solução de tripsina removido e adicionados 10 µL de bicarbonato de amônio para cobrir o gel. As amostras permaneceram em *overnight* a 37 °C.

No segundo dia, foram adicionados de 10 µL a 30 µL da solução de extração 1 (ácido fórmico 5% (v/v) em água miliQ) em cada microtubo (de acordo com o tamanho do gel), incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, dado um *spin* rápido em centrífuga e o sobrenadante foi coletado e transferido em outro microtubo. Então, foram adicionados 12 µL da solução de extração 2 (ácido fórmico 5% (v/v) em acetonitrila 50 % (v/v)) em cada microtubo, novamente mantidos por 10 minutos a temperatura ambiente, dado um *spin* rápido em centrífuga e então o sobrenadante foi coletado e transferido para o tubo que foi previamente separado e já contem o extrato do passo anterior. Este passo foi repetido mais uma vez.

Por fim, as amostras foram evaporadas no *speed vac* de forma que restasse aproximadamente 1 µL de amostra. As amostras foram armazenadas a - 20 °C até serem transferidas para a espectrometria de massas.

### **3.10 Cromatografia líquida e espectrometria de massas**

Para a aplicação das frações tripsinizada no LC-MS/MS cada amostra foi ressuspensa com 12 µL de ácido fórmico 0,1% (v/v), e uma alíquota de 4,5 µL da mistura de peptídeos foi injetado no cromatógrafo RP-nanoUPLC (nanoAcuity, Waters). A cromatografia foi realizada em coluna C18 (100 µm × 100 mm) equilibrada com tampão de 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi de 2% a 90% de acetonitrila (v/v) em 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Todo o sistema operou com a velocidade de 0,6 µL/min. A medida que os peptídeos eram eluídos da coluna, os mesmos eram injetados no espectrômetro quadrupolo-tempo de voo Q-Tof (Ultima Mass Spectrometer, Waters) com fonte de ionização do tipo elétron spray durante 60 minutos. O instrumento foi operado no modo “top three - MS e MS/MS”, onde para cada espectro de MS adquirido, os seus três peptídeos não monocarregados (precursores) mais abundantes eram selecionados para posterior fragmentação (gerando séries y e b) e sequenciados gerando um espectro MS/MS de cada peptídeo.

Os espectros foram adquiridos usando o *software* MassLynx v.4.1 (Waters - Milford, MA, USA) e os dados brutos foram convertidos para o formato “peak list format (mgf)”, pelo *software* Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.). Estes resultados foram

processados pelo *software* Mascot v.2.3.01 engine (Matrix Science Ltd.), utilizando o banco de dados do sequenciamento do genoma das linhagens 2HH e M29 de *P. echinulatum* (2HH: 8504 sequências, 4286814 resíduos; M29: 8552 sequências, 4298942 resíduos) para a digestão e geração dos espectros de MS/MS téoricos. Os seguintes parâmetros foram usados nesse processamento: carbamidometilação como uma modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável, um erro de clivagem para a tripsina e erro máximo permitido na massa do peptídeo de 0,1 Da. Somente peptídeos com no mínimo 5 aminoácidos e com score dentro da probabilidade de não ser um evento aleatório  $p < 0,05$  foram selecionados como um produto de clivagem peptídica (ou seja, são parte de uma proteína). O peptídeo foi considerado único quando o mesmo difere em pelo menos um aminoácido de outro ou ainda quando difere em modificações covalentes (incluindo elongações de N- ou C-terminais).

### **3.11 Análise dos resultados**

Análise dos dados referentes ao cultivo foram realizados no *software* PrismGraphPad (versão 5.0.1.334) e Microsoft Excel. Os resultados, quando necessário, foram analisados pela variância e pós-teste de Tukey para  $p < 0,05$  e Teste-t (*Student's test*) para  $p < 0,05$ .

Quanto à análise de dados de espectrometria de massas, empregou-se uma série de ferramentas de bioinformática para construir uma tabela de secretômica. Para validação dos dados da secretômica foi utilizado o *software* Scaffold 4 Proteomic (versão 4.3.2 20140225). Condições definidas para aceitar a identificação de uma proteína foi uma probabilidade acima de 99%, com o mínimo de dois peptídeos diferentes para a identificação da proteína, cada um com 95% de certeza. Os resultados da pesquisa mantiveram a taxa de falsa descoberta (FDR) dos peptídeos e das proteínas igual a zero.

A fim de verificar se as sequências das proteínas anotadas dos genomas das linhagens 2HH e S1M29 com identificações diferentes tratavam-se das mesmas, foi realizado o alinhamento das proteínas, empregando o *software* Clustal Omega (*Multiple Sequence Alignment – EMBL-EBI*) [62].

Verificadas as sequências de proteínas, as mesmas foram identificadas, empregando o *software* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [63]. Os parâmetros utilizados para fazer a escolha das proteínas foram: e-value  $\leq e^{-40}$ ; identidade  $\geq 40\%$  e query cover  $\geq 80\%$ .

Com o objetivo de encontrar proteínas ativas sobre carboidratos (CAZymes), bem como a presença ou não de módulos de ligação a carboidratos, empregou-se o *software* dbCAN ( *DataBase for Carbohydrate-active enzyme ANotation*).

A presença ou não de peptídeo sinal foi realizada empregando-se os *softwares* SignalP (versão 4.1 – *Server-CBS*), SecretomeP (versão 2.0) e YLoc (Interpretable Subcellular Localization Prediction).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados das atividades enzimáticas e secretômica da linhagem selvagem 2HH e mutante S1M29 de *P. echinulatum*. Os seguintes resultados e discussões foram organizados em dois capítulos, os quais representam dois artigos a serem submetidos a periódicos.

- 1. The potential of *Penicillium echinulatum* strains to the enzymes production for cell wall hydrolysis and their application in second-generation ethanol technologies.** Willian Daniel Hahn Schneider, Thiago Augusto Gonçalves, Cristiane Akemi Uchima, Laísa dos Reis, Roselei Claudete Fontana, Fabio Marcio Squina, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola. – **Artigo original submetido ao periódico *Biomass & Bioenergy*.**
  
- 2. Secretome analysis of *Penicillium echinulatum* strains reveals its potential for degradation of lignocellulosic biomass.** Willian Daniel Hahn Schneider, Thiago Augusto Gonçalves, Cristiane Akemi Uchima, M. Brian Couger, Rolf Prade, Fabio Marcio Squina, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola. – **Artigo original a ser submetido ao periódico *Biotechnology for Biofuels*.**

## The potential of *Penicillium echinulatum* strains to the enzymes production for cell wall hydrolysis and their application in second-generation ethanol technologies

Willian Daniel Hahn Schneider<sup>a</sup>, Thiago Augusto Gonçalves<sup>b</sup>, Cristiane Akemi Uchima<sup>b</sup>, Laísa dos Reis<sup>a</sup>, Roselei Claudete Fontana<sup>a</sup>, Fabio Marcio Squina<sup>b</sup>, Aldo José Pinheiro Dillon<sup>a</sup>, Marli Camassola<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Enzymes and Biomass Laboratory, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory – CTBE, Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, Pólo II de Alta Tecnologia, Caxia Postal 6192, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil.

\*corresponding author: Tel./fax: +55 54 3218 2681

E-mail address: [mcamassola@gmail.com](mailto:mcamassola@gmail.com) (M. Camassola)

### Highlights

- Glycerol acts as an inducing source for avicelases.
- Sugar cane bagasse is an efficient inducer for cellulolytic and hemicellulolytic enzymes better than cellulose;
- *Penicillium echinulatum* produces high titers of esterases.
- The mutant strain produces enzyme complex with the greatest potential for enzymatic hydrolysis.

### Keywords

CAZymes, *Penicillium echinulatum*, enzyme production, carbon sources.

### Abstract

One of the current challenges to produce second-generation ethanol is to obtain an efficient enzyme complex for hydrolysis of lignocellulosic biomass. Genetic improvement of lignocellulolytic fungi has helped to obtain strains that secrete higher enzymatic titers. This article analyzes the enzymatic profile of two strains of *Penicillium echinulatum*, wild type

2HH and mutant S1M29, grown on different carbon sources (sugar cane bagasse pretreated by steam explosion, cellulose, glucose, and glycerol) at different cultivation times. To determine enzyme activities, 23 substrates were used. *P. echinulatum* showed potential to produce cellulases, hemicellulases, esterases, and in minor proportions, pectinases. The mutant strain showed the highest enzymatic titers to most enzymes considered. This study broadened the understanding of the enzyme complex of this fungus and the importance of future studies with the mutant strain for its use in the production of second-generation ethanol.

## 1. Introduction

In recent years, the interest in reducing the dependence on fossil fuels and increasing the amount of renewable raw materials in the energy supply chain has grown, due to environmental and economic concerns. The lignocellulosic residues are a promising alternative that can be effectively hydrolyzed into fermentable sugars for the production of second-generation ethanol and integrated in the context of a biorefinery without competing with the food supply chain [1-3].

Lignocellulosic biomass is the most abundant natural material present on Earth [4] and is composed of four major polymer blocks: the polyphenol lignin and three polysaccharides: cellulose, hemicellulose, and pectin. In combination with enzymes associated with plant cell wall, structural proteins, and proteoglycans, these components form an intricate and connected network that provides strength and durability to the plant cell wall [5]. The deconstruction of lignocellulosic biomass requires an efficient enzyme complex, mainly produced by fungal and bacterial genera [6], that enables the release of fermentable sugars [7].

To degrade cellulose fiber, homopolysaccharide, formed by units of  $\beta$ -glucopyranose (D-glucose) joined by  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds, endoglucanases are necessary. These adhere to internal bonds of the cellulose chain; exoglucanases or cellobiohydrolases, which adhere to molecules of cellobiose from reducing and non-reducing ends of cellulose fiber; and  $\beta$ -glucosidases, which hydrolyze cellobiose into two glucose molecules [8].

Hemicellulose comprises a diverse group of polysaccharides; therefore, it is considered to be a heteropolysaccharide composed mainly of xylan, but may also include arabinoxylan, xyloglucan, mannan, glucomannan, and galactomannan. Its hydrolysis requires the action of xylanases, xyloglucanases,  $\beta$ -xylosidases, endomananases, mannosidases, arabinofuranosidases, and other enzymes [9].

Arabinan, galactan, and arabinogalactan do not fit the classification of hemicellulose and can be grouped with pectins [10]. Pectin, a complex polysaccharide containing the primary chain of D-galacturonic acid, consists of four major structural classes: homogalacturonan, rhamnogalacturonan I, xylogalacturonan, and rhamnogalacturonan II [11]. For hydrolysis of the structure, polygalacturonases, rhamnosidases, pectin lyases, arabinanases and others are necessary.

The function of esterases in the hydrolysis of lignocellulosic material includes breaking bonds between the main part of the hemicellulose and many kinds of lateral chains [9]. Feruloyl esterases separate hemicellulose from lignin by breaking the ester bond between ferulic acid and hemicelluloses [12]. Feruloyl esterases also act to disrupt lateral chains of structures in the pectin [11].

The ability of filamentous fungi to secrete a pool of proteins has motivated their intensive use in the production of industrial enzyme cocktails [13]. Mutant strains of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* are among the most studied and used microorganisms for the production of enzymes for hydrolysis of plant cell wall. However, many species of *Penicillium* have been reported to produce enzyme systems with higher performance than *T. reesei* and *A. niger* [14]. Among the species of *Penicillium*, *P. echinulatum* has been the focus of attention because of its potential to produce high enzyme titers of cellulase and is considered a promising strain for the second-generation ethanol industry [15, 16].

Therefore, it is very important to study secretomics involving strains of *P. echinulatum*, because the evolutionary process of such strains and the changes that occurred at the enzymatic level are unknown. The aim of this study was to determine and evaluate activities of different enzymes involved in the degradation of lignocellulosic material of broths obtained from wild type 2HH and mutant S1M29 of *P. echinulatum* in submerged culture, using sugar cane bagasse pretreated by steam explosion, cellulose, glucose, and glycerol as carbon sources.

## 2. Material and methods

### 2.1 Growth and maintenance of *Penicillium echinulatum* strains

The wild type 2HH and mutant S1M29 strains of *P. echinulatum* were grown and maintained in 100 mL of cellulose agar (agar-C) consisting of 40 mL of swollen cellulose, 10 mL of mineral solution, 0.1 g of proteose peptone (Oxoid L85<sup>®</sup>), 2 g of agar, and 50 mL of

distilled water. The strains were grown in inclined tubes on C-agar for 7 days at 28 °C until the formation of conidia and then stored at 4 °C as in Dillon et al. [17].

All mutant strains of *P. echinulatum* used in studies for the production of cellulases are decedents of the wild type called 2HH isolated from *Anobium punctatum* beetle larvae. A mutant strain 9A02S1 of *P. echinulatum* was obtained from the 2HH strain, after several steps of mutagenesis, characterized as a mutant partially derepressed by glucose. This microorganism is deposited in the *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942. The mutant S1M29 strain of *P. echinulatum* was obtained from the 9A02S1 strain, through employing hydrogen peroxide mutagenesis and selection of mutants in medium supplemented with 2-deoxyglucose [16].

## 2.2 Production of enzymes

The culture medium for enzyme production consisted of 0,2 g peptone, 0,05 g Prodex® 1 g carbon source, 0,1 g Tween 80®, 5 mL mineral solution [18] and distilled water to complete a final volume of 100 mL.

Then, 500 mL Erlenmeyer flasks, containing 100 mL of the production medium, were inoculated with a suspension of  $1 \times 10^5$  conidia per mL and kept at 28 °C, in a reciprocal agitation of 180 rpm for 120 h. The experiment was performed in triplicate and samples were collected every 24 h to measure the mycelial growth. Supernatants of 48, 96, and 120 h of cultivation were separated for enzymatic analysis, following the study of Schneider et al. 2014 [23]. The samples were kept under refrigeration and sodium azide for a final concentration of 0,02% (w/v).

To evaluate the effect of different carbon sources on the production of enzymes by the wild type and mutant *P. echinulatum*, were employed: cellulose Celuflok E® (Celuflok Comercial Ltda, Cotia, SP, Brazil), sugar cane bagasse pretreated by steam explosion (SCB) (Usina Vale do Rosário, Morro Agudo, SP, Brazil), glucose (Quimidrol - Joinville, SC, Brazil), and glycerol (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA).

## 2.3 Direct determination of cell growth

The mycelial growth on the media containing glycerol or glucose as carbon sources was gravimetrically determined. For this, 100 mL of culture were centrifugation at 9600 g for 20 min. After removal of supernatant, pellets were washed three times with distilled water (10 mL) and dried at 40 °C under reduced pressure until a constant weight.

## 2.4 Indirect determination of cell growth

The fungal biomass of media containing cellulose or SCB as carbon sources was determined indirectly by the enzymatic hydrolysis of chitin from the cell wall, as described by Novello et al. [19].

## 2.5 Enzyme dosages

The enzymatic activity of the collected supernatants was tested using a set of 23 different substrates (Megazyme - Wicklow, Ireland and Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA) in order to measure the activity of cellulases, hemicellulases, pectinases, esterases and amylases.

To determine the cellulases, the following substrates were employed: Filter paper,  $\beta$ -glucan, Avicel<sup>®</sup>, carboxymethylcellulose (CMC), laminarin (from *Laminaria digitata*), lichenan (from *Cetraria islandica*),  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-celllobioside ( $\rho$ NPC), and  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ( $\rho$ NPG).

The following substrates were employed to determine the hemicellulases: xylan, rye arabinoxylan, wheat arabinoxylan, xyloglucan,  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside ( $\rho$ NPX) mannan, galactomannan, and locust bean gum (from *Ceratonia siliqua* seeds).

Pectinases were measured using pectin substrate (from citrus fruits), larch arabinogalactan debranched arabinan, arabinan (from sugar beet), and  $\rho$ -nitrophenyl- $\alpha$ -D-arabinofuranosidase ( $\rho$ NPA). Feruloyl esterases were determined with feruloyl acetate and amylases were dosed with potato starch substrate.

All enzymatic activities were performed in triplicate. The methodology employed to determine enzymatic activities was performed according to Cota et al. [20] with modifications, where 50  $\mu$ L of substrate solution (0.5% w/v of the substrate diluted in water) were added to 46  $\mu$ L of enzyme solution and 4  $\mu$ L of sodium citrate buffer 1 mol/L, pH 4.8. The mixture was incubated at 50 °C for different periods depending on the substrate. The reaction time of cultivation was 30 min for potato starch, Avicel<sup>®</sup>, arabinan, CMC, debranched arabinan, galactomannan, laminarin, larch arabinogalactan, locust bean gum, mannan, pectin, wheat arabinoxilan, xyloglucan,  $\rho$ NPA,  $\rho$ NPX,  $\rho$ NPC, and  $\rho$ NPG (for the latter two, 20 mL of enzyme solution, 30  $\mu$ L of sodium citrate buffer 1 mol/L dilute to the samples containing cellulose or SCB). The reaction time of 10 min was used for lichenan and  $\beta$ -glucan for samples containing SCB or cellulose (10  $\mu$ L enzyme solution, 4  $\mu$ L sodium citrate buffer, and 36  $\mu$ L distilled water); 10 min for xylan and rye arabinoxilan for samples of

the mutant strain grown in SCB or cellulose (10 µL enzyme solution, 4 µL sodium citrate buffer, and 36 µL distilled water). The Filter Paper Activity (FPA) was determined according to the methodology described by Camassola and Dillon [21].

The reactions with filter paper and the remaining polysaccharides were stopped by adding 300 µL and 100 µL of DNS reagent solution, respectively. The reactions carried out with pNP substrates were stopped by adding 100 µL of sodium carbonate 10% (m/v).

The activity of feruloyl esterases was determined according to the methodology described by Koseki *et al.* [12]. For the samples containing cellulose or SCB were used 5 µL of enzyme solution, 20 µL of sodium acetate buffer (SAB) 100 mmol/L, pH 5.5, and 15 µL distilled water was added. For samples containing glucose or glycerol as carbon sources, 20 µL of enzyme solution and 20 µL of 100 mmol/L SAB buffer were used. Then, 10 µL of substrate (50 mmol/L solution in Dimethyl sulfoxide – DMSO) was added, incubated at 40 °C in a thermocycler for 30 min. Next, the reaction was stopped by adding 100 µL solution of Fast Garnet reagent (0.1% w/v *Fast Garnet* and SDS 15% w/v in DMSO) and kept at room temperature for 10 min.

The units of enzymes with activity on the polysaccharides were assumed as the amount of enzyme capable of releasing 1 µmol of reducing sugar per min. Units of enzyme with activity on the p-nitrophenyl substrates were assumed as the amount of enzyme capable of liberating 1 µmol of p-nitrophenyl per min. Feruloyl esterases were assumed as the amount of enzyme capable of liberating 1 µmol of α-naphthyl acetate per minute.

## 2.6 Analysis of the results

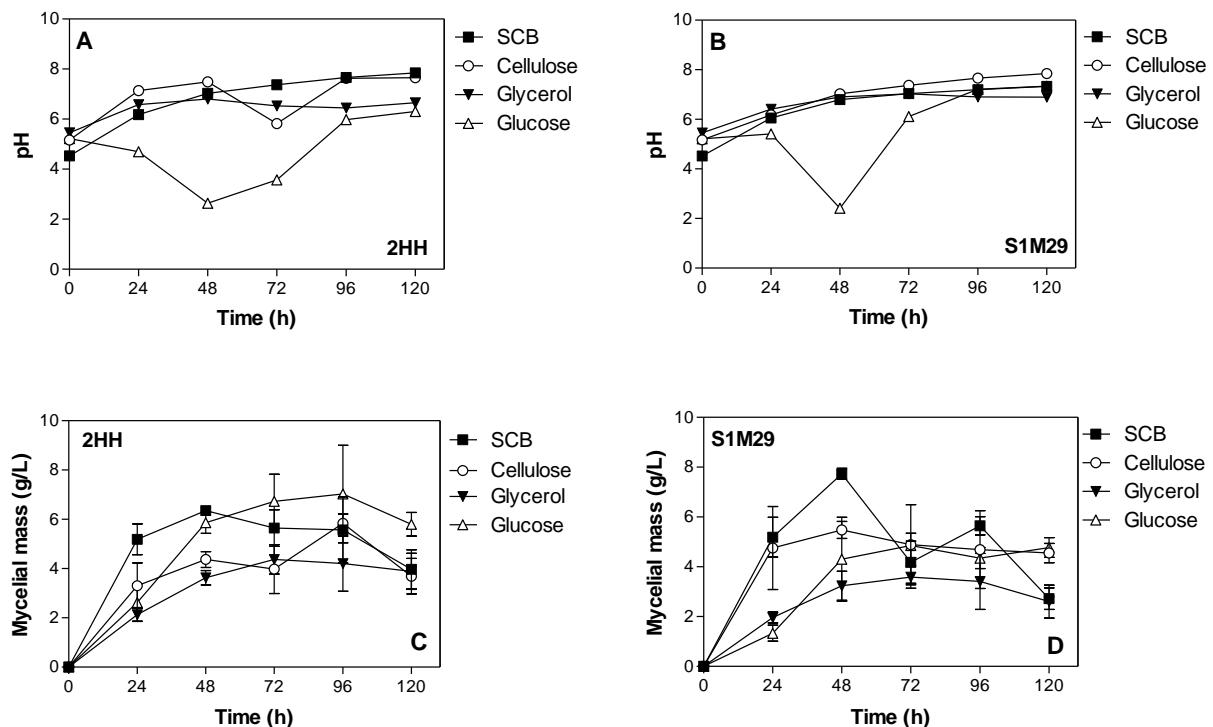
The analysis of data regarding to pH, cell growth and enzyme activities were performed in PrismGraphPad (version 5.0.1.334) software. The results, when necessary, were analyzed by variance and Tukey's post-test for a p<0.05 and T-test (Student's test) for a p<0.05.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Variations in pH and mycelial growth

The variations in pH in both the culture with the wild type 2HH and the mutant S1M29 strains of *P. echinulatum* were similar (Figs. 1A-1B). The pH oscillated in a range of 2.4 - 7.8 in cultures with both strains using the four different carbon sources. Fluctuations in pH were similar in both studied strains. Minor variations of pH were observed in the culture

media formulated with SCB or glycerol. The media formulated with glucose or cellulose showed decreased pH value after 24 and 48 h (for 2HH strain) of culture, respectively, suggesting that these carbon sources, which are constituted by the free or grouped hexoses, provided the greatest fungal metabolism. Smaller decreases in pH values may be due to the more complex constitution of the sample, as SCB, containing different substances that contributed to the buffering of the medium. Glycerol, a molecule of low and simple molecular weight compared to the SCB, is possibly consumed by routes that do not cause or reduce the production of organic acids or H<sup>+</sup> ions that are released into the medium.



**Fig.1.** Variations in pH (A and B) and mycelial growth (C and D) of wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* in submerged cultures using different carbon sources.

In filamentous fungi cultures with uncontrolled pH, a decrease in pH occurs during growth on carbohydrate substrates, and after depleting the carbon source, an increase in pH is observed [22]. Therefore, the decrease in pH occurs due to consumption of ammonia present in the production medium in the form of ammonium sulfate with the release of H<sup>+</sup> ions into the medium.

Similar behaviors were seen by Schneider et al. [23] who used six different carbon sources and found changes in pH in the culture with *P. echinulatum*, S1M29 strain, in medium formulated with glucose or sucrose, two carbon sources, which are easy and rapidly

assimilated by the fungus. The rapid metabolism in the medium with glucose as carbon sources may also have occurred in parallel with the fastest rise in pH. These data are in agreement with studies of Sternberg and Dorval [24], who also found that pH can be a indicative parameter of the intensity of metabolism, compared to growth, analyzing the fungus kinetics growth in glucose for both strains.

All the carbon sources were used for both strains; however, the amount of mycelial mass varied in the strains during the 120 h of cultivation for all the tested carbon sources (Figs. 1C-1D). There was notable increase in mycelial mass after 24 h of cultivation for all carbon sources and for both strains. It was observed a small decrease in pH in cellulose medium with de wild type, but mycelial mass increase was observed in both strains in media formulated with cellulose.

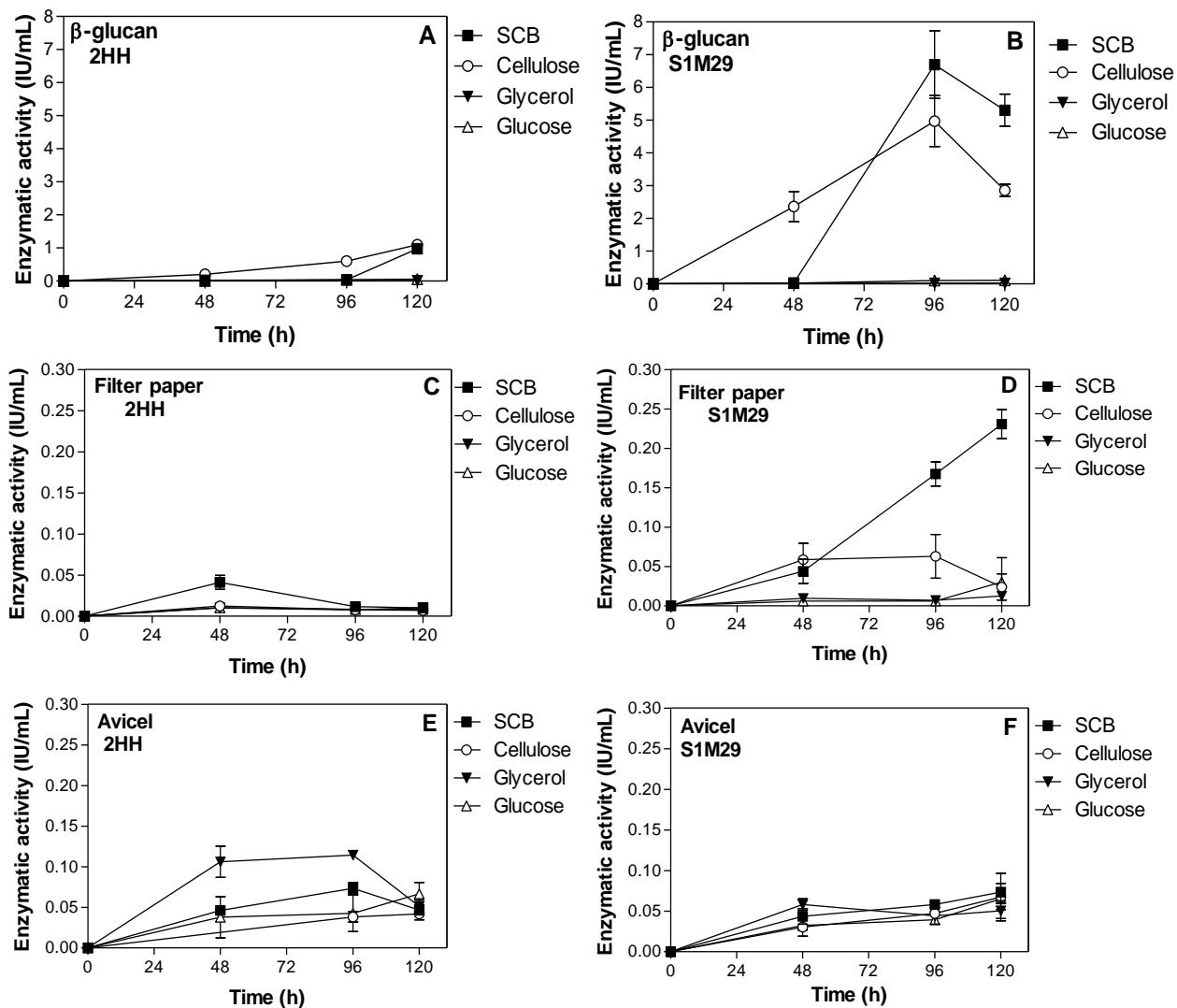
### *3.2 Enzymatic activities in cellulosic substrates*

Different substrates were used to dose cellulases. Activities by the S1M29 strain on  $\beta$ -glucan and filter paper substrates were the highest of all (Fig. 2). For  $\beta$ -glucan substrate the culture media formulated with SCB or cellulose peaked at  $6.7 \pm 1.037$  IU/mL and  $4.97 \pm 0.777$  IU/mL, respectively, at 96 h cultivation (Fig. 2B). When the 2HH strain was used, the mediums with SCB or cellulose showed the best results again, but did not reach 1 IU/mL (Fig. 2A), which demonstrates a greater potential of the enzyme broth secreted by the mutant strain S1M29.

For activity on filter paper in all carbon sources tested with the 2HH strain, the enzymatic activities were not greater than 0.05 IU/mL (Fig. 2C) while the culture medium using the S1M29 strain reached  $0.23 \pm 0.018$  IU/mL and  $0.06 \pm 0.027$  IU/mL when SCB (120 h) or cellulose (96 h) were used as carbon sources, respectively (Fig. 2D). Medium using glucose or glycerol with the S1M29 strain had a small increase of activity at 120 h of cultivation.

Regarding to avicelase activities profile, the wild type strain 2HH presented the greatest activity when the fungus was grown in glycerol (Fig. 2D). The S1M29 strain had similar activity peaks for all carbon sources tested (Fig. 2F). The maximum activities were detected in SCB medium at 120 h of cultivation, which were around 0.073 IU/mL (no statistical differences were observed between the carbon sources, according to Tukey' test,  $p>0.05$ ). The culture medium using the 2HH strain showed a similar profile to S1M29, except with the medium formulated with glycerol, which showed significantly higher enzyme activity (0.114 IU/mL) (Student's test  $p<0.05$ ) at 96 h of cultivation. Thus, it is evident that

the production of avicelases showed no major differences between the strains employed when the determination is made using this enzyme and done with microcrystalline cellulose Avicel® as substrate.



**Fig 2.** Enzymatic activities in cellulose substrates of wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* in submerged cultures using different carbon sources.

### 3.2.1 Cellobiohydrolases

Cellobiohydrolases were measured using  $\rho$ NPC substrate (Figs. 3A-3B), which found major differences in the production of this enzyme. For this substrate, the mutant strain showed the highest secretion of these enzymes. The highest activities were around 0.1 IU/mL for the medium formulated with SCB and 0.15 IU/mL for the medium formulated with glucose, both at 120 h.

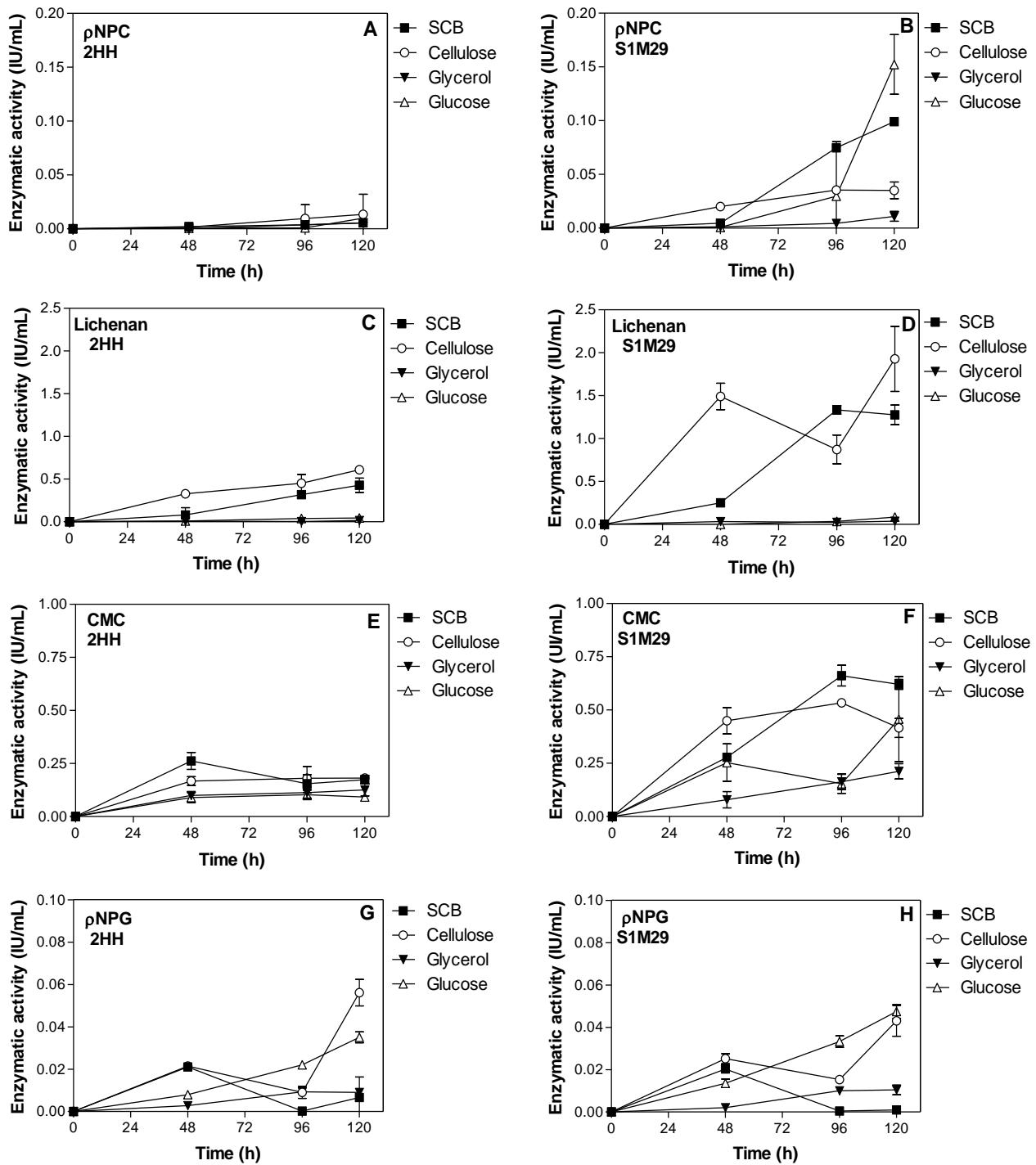
### 3.2.2 Endoglucanases

The activity of endoglucanases clearly showed the difference in the production of this enzyme between the two strains (Fig. 3). When the substrate lichenan was used (Fig. 3D), the highest activities were detected in the medium with cellulose (1.93 IU/mL) and in the medium with SCB (1.33 IU/mL). Despite being three times lower, liquenanase activities of the 2HH strain (Fig. 3C) followed a similar profile as S1M29; however, the activities were increased with enzyme peaks at 120 h of cultivation.

When CMC was used as the substrate for determining the activity of endoglucanases, the maximum activity of the 2HH strain was 0.26 IU/mL of endoglucanases produced when grown in SCB medium at 48 h (Fig. 3E). The medium formulated with SCB or cellulose grown with the S1M29 strain reached peaks of  $0.69 \pm 0.066$  IU/mL and  $0.53 \pm 0.008$  IU/mL, respectively, both at 96 h of cultivation (Fig. 3F). Statistical differences were observed in SCB activities for both strains comparing to another carbon sources ( $p<0.05$ ). The increased activity for medium formulated with glucose or glycerol was noteworthy at 120 h with the S1M29 strain, reaching peaks of  $0.46 \pm 0.199$  IU/mL for glucose and  $0.21 \pm 0.035$  IU/mL in glycerol, showing statistical differences. When the laminarin substrate was used (supplementary material), there was little difference between the enzymatic activity and smaller endoglucanases activities were detected for all substrates for this enzyme dosage.

### 3.2.3 $\beta$ -glucosidase

The activities of  $\beta$ -glucosidase on pNPG substrates were reduced (Fig. 3). In cultures performed with both 2HH and S1M29 strains, the activities were lower than 0.06 IU/mL. Cellulose provided the highest activities for 2HH (Fig. 3G) ( $0.053 \pm 0.007$  IU/mL), while media formulated with glucose or cellulose allowed the highest activities of  $\beta$ -glucosidase in culture with S1M29 ( $0.043 \pm 0.003$  IU/mL), both at 120 h (Fig. 3H). No statistical differences were observed between activities in cellulose (2HH) and glucose (S1M29) at 120 h ( $p>0.05$ ).



**Fig.3.** Cellobiohydrolases (A – B) endoglucanases (C – F) and  $\beta$ -glucosidases (G – H) secreted by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* in submerged cultures using different carbon sources.

The activities of cellulases obtained in this study corroborate the results obtained by Schneider et al. [23], who found higher activities of cellulases in medium formulated with SCB or cellulose, when the S1M29 mutant strain was employed and 1% (w/v) of carbon sources were used. Likewise, Novello et al. [19] also detected higher enzyme titers of FPA and endoglucanases when the S1M29 strain was used, in the same conditions, in medium

prepared on cellulose, than when other carbon sources were used, such as glucose or xylose in the culture or with other strains of *P. echinulatum*.

Juhász et al. [25] tested different carbon sources on production of cellulases of *T. reesei* Rut-C30 and found that the maximum FPA activities (1.2 IU/mL) were obtained using *Solka Floc*<sup>®</sup> cellulose at 168 h of cultivation. Ilmen et al. [26] verified insignificant levels of cellulases production with glucose, fructose and glycerol. According to the authors, glucose caused catabolite repression in *T. reesei* QM9414. This possibly explains the low enzymatic activities of *P. echinulatum* in medium formulated with glucose, in most substrates employed to characterize the enzyme pool of *P. echinulatum*, i.e. glucose is not an inducing source of cellulase. However, cellulose and SCB acted as inducers of cellulase in this study. Delabona et al. [27] reported obtaining higher activities of FPA (0.78 IU/mL) using SCB treated by steam explosion. That study used the P49P11 strain of *Trichoderma harzianum*, and the evaluated carbon sources were SCB, sucrose, glycerol, lactose and fructooligosaccharides.

The results obtained for cellulase activity are consistent with the data obtained by Mandels and Reese [18], who suggested that the expression of cellulase does not occur on carbon sources that promote rapid growth as glucose and glycerol, but from more complex sources such as cellulose or disaccharides like cellobiose or lactose. However, the statement does not explain the enzymatic profile observed when the 2HH strain was grown in a medium containing glycerol when the avicelase activity was higher. Therefore, it is suggested that the medium formulation for the production of enzymes for hydrolysis of lignocellulosic be performed using glycerol by product from the biodiesel as a soluble inducing carbon source.

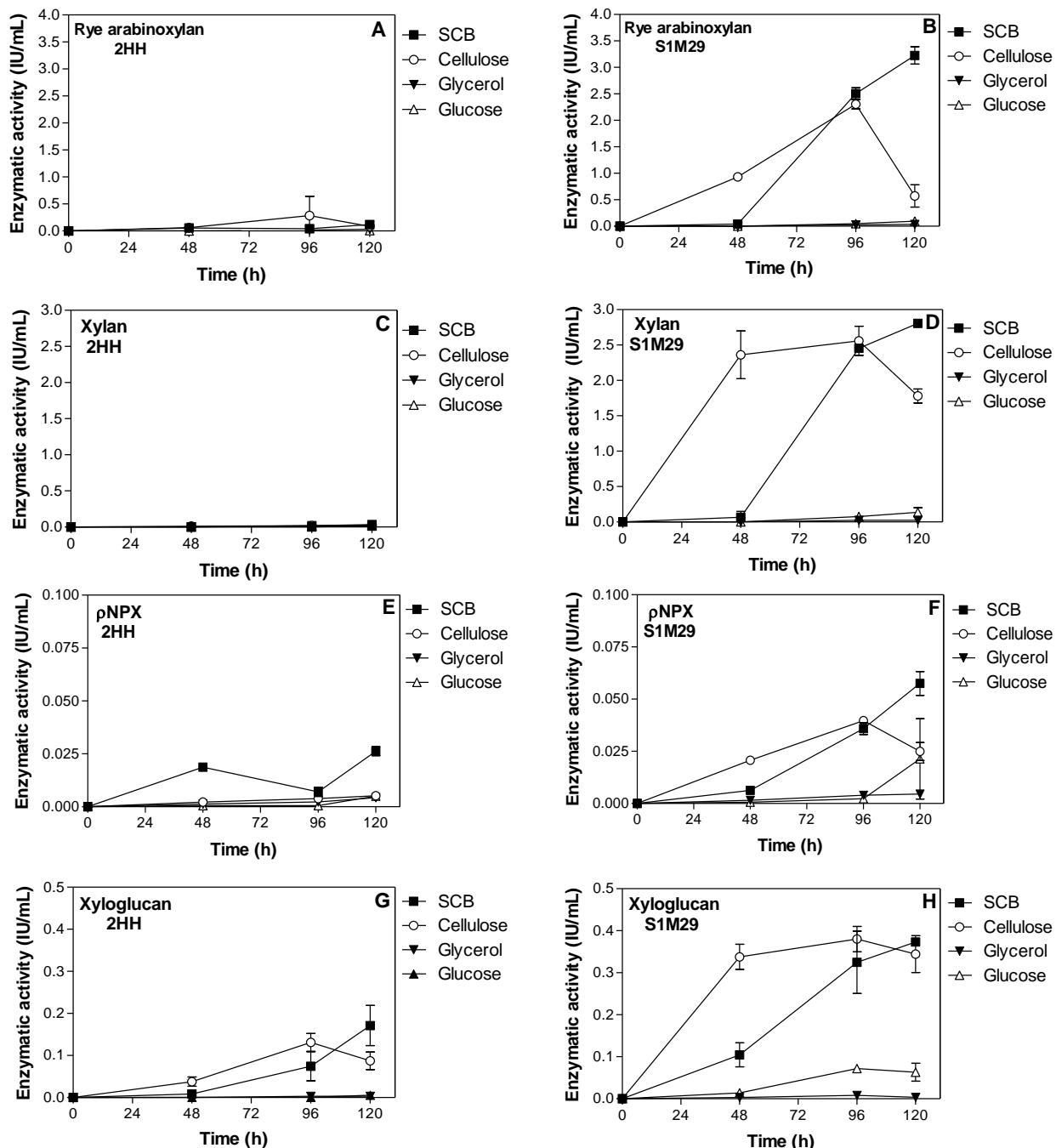
It's possible that the highest cellobiohydrolase activity in the medium prepared with glucose, at 120 h, be related to the fact that *P. echinulatum* has produced this enzyme to hydrolyze carbohydrates present in the fungal cell wall, occurring a cell lysis process. Another possible explanation is that the substrate pNPC may have been degraded by another enzyme secreted by the fungus in glucose medium.

### 3.3 Enzymatic activities in hemicellulose substrates

#### 3.3.1. Xylanases

High enzymatic activities were detected using rye arabinoxylan as substrate and again the media formulated with SCB or cellulose showed values of enzyme activity higher for the S1M29 strain (Fig. 4B). In fact, the activities using the mutant strain were relatively higher to the wild type (Fig. 4A) reaching  $3.22 \pm 0.164$  IU/mL with SCB and  $2.41 \pm 0.001$  IU/mL with cellulose, in 120 and 96 h, respectively. Again, the enzymatic activities of the medium

prepared with glucose or glycerol were low. The substrate xylan from beechwood also provided elevated enzymatic activity (Figs. 4C-4D), but only when the enzyme broths produced by the S1M29 strain grown on cellulose or SCB were used. The produced xylanases were in the range of  $2.81 \pm 0.035$  IU/mL when SCB was used in 120 h of cultivation, and  $2.56 \pm 0.205$  IU/mL when cellulose was used as a carbon source, for 96 h (Fig. 4D).



**Fig.4.** Xylanases (A – D),  $\beta$ -xylosidases (E – F) and xyloglucanases (G – H) secreted by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* in submerged cultures using different carbon sources.

However, when other substrates for measurement of xylanases were used, including pNPX (Figs. 4E and 4F) and wheat arabinoxylan (supplementary material), lower activities were achieved. The activities of wheat arabinoxylan obtained at 120 h were 0.21 IU/mL when SCB was used, and 0.13 IU/mL for the cellulose using the S1M29 strain. The enzyme broths secreted by 2HH and S1M29 demonstrated  $\beta$ -xylosidases activity on the substrate pNPX lower than 0.1 IU/mL, where the mutant strain again produced the highest titer of this enzyme. The enzymatic peaks of  $\beta$ -xylosidases were detected when both strains were grown in culture medium formulated with SCB, at 120 h cultivation.

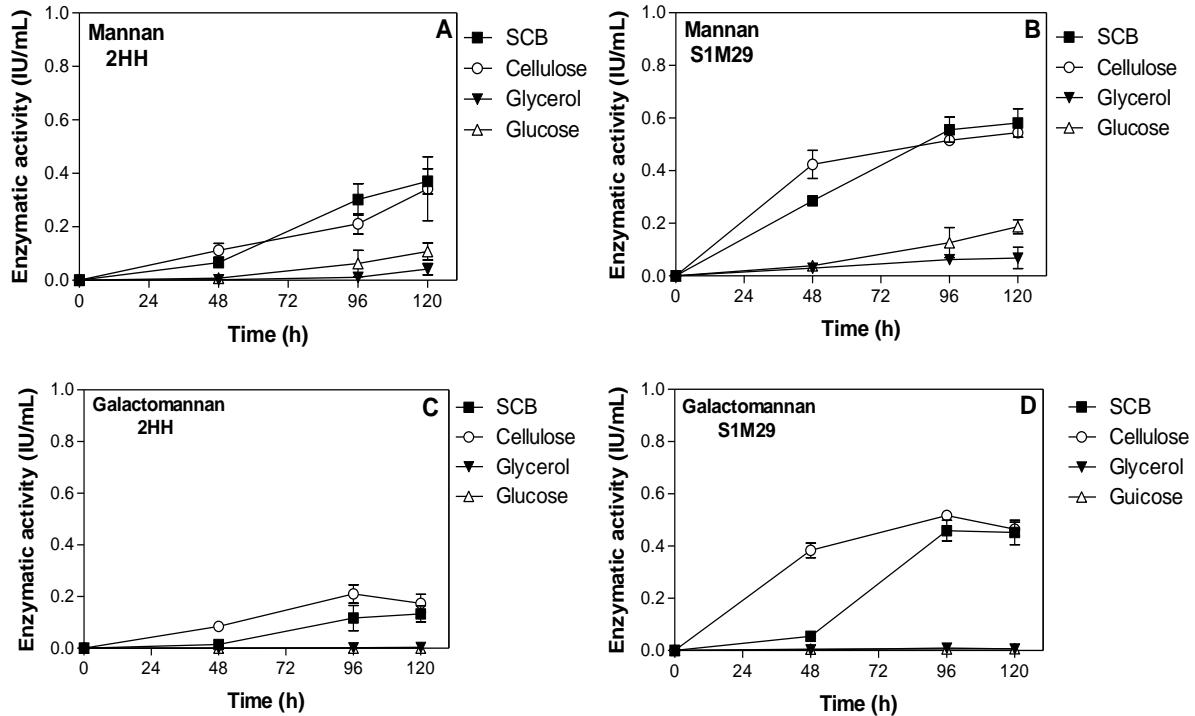
### *3.3.2. Xyloglucanases*

Activities using xyloglucan as substrate were detected at low levels. The medium formulated with cellulose reached of 0.38 IU/mL of xyloglucanase activities in 96 and 0.37 IU/mL in SCB, at 120 h of cultivation when the S1M29 strain was employed (Fig. 4G). The wild type strain produced 0.19 IU/mL and 0.13 IU/mL xyloglucanases, in medium with SCB or cellulose, respectively (Fig. 4H).

### *3.3.3 Mannanases*

Mannanase activities were measured using mannan, galactomannan, (Fig. 5) and locust bean gum (supplementary material) as substrates. The highest enzymatic titers were achieved when the mannan and galactomannan substrates were employed, verifying that medium formulated with cellulose or SCB were again more efficient when compared with glucose and glycerol. The enzymatic peaks using mannan as substrate were achieved in medium with SCB or cellulose in 120 h of cultivation and were around 0.55 IU/mL with the S1M29 strain (Fig. 5B) and 0.35 IU/mL with the 2HH strain (Fig. 5A). No statistical differences were observed in wild type and mutant between activities at 96 and 120 h in SCB, according Student's test ( $p>0.05$ ). The maximum activity of the mannanases in the mutant strain on the galactomannan substrate was  $0.51 \pm 0.012$  IU/mL and  $0.46 \pm 0.040$  IU/mL, at 96 h of cultivation, when cellulose or SCB were used, respectively, with statistical differences ( $p<0.05$ ) (Fig. 5D). When glucose or glycerol was employed, no activities were detected on the galactomannan substrate. The same happened with the broths produced by the 2HH strain (Fig. 5C); maximal activity of the mannanases in the medium formulated with cellulose was  $0.21 \pm 0.035$  IU/mL and SCB was  $0.13 \pm 0.031$  IU/mL, which is less when compared with the S1M29 strain, showing no statistical differences ( $p>0.05$ ). But, significant differences were

observed for activities in cellulose comparing both strains at 96 h. Following the same enzymatic profile, the activity of the mannanases on the locust bean gum substrate was lower compared to mannan and galactomannan substrates.



**Fig.5.** Mannanases secreted by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* in submerged cultures using different carbon sources.

The analysis of the enzymatic profile of secreted hemicellulases demonstrates once again the difference between the production of these enzymes on the used strains, confirming that the mutant strain produces more hemicellulases than the wild type.

Novello et al. [19] in a study involving three strains of *P. echinulatum*, a wild type and two mutant strains, showed different levels of xylanase expression with different carbon sources for the different strains employed. They found evidence for a change in transcription and translation in relation to the expression of xylanases in the tested strains, because the mutant strains secreted more xylanolytic enzymes. Although xylanolytic activity was identified when cellulose was used as a carbon source, higher enzymatic activities were achieved when xylose was used as the carbon source, showing the importance of the inducing source.

Some hemicellulolytic enzymes worth mentioning in this work, such as certain xylanases determined on the rye arabinoxylan and beechwood xylan substrates, were produced in high titers when S1M29 strain was employed. Schneider et al. [23] also detected

higher xylanase activity when cellulose or SCB were used as a carbon source compared with glucose and glycerol. Similar data were reported by Zampieri et al. [29] for the 9A02S1 strain of *P. echinulatum* and by Seyis and Aksoz [30] in the fungus *T. viride* in medium formulated with glucose, indicating a possible constitutive production of xylanase. Other studies associated with constitutive xylanolytic activities in *Trichoderma* sp. [31] showed that basal levels of xylanolytic activity correspond to the activity of xylanase *xyn 2*, whose transcription was not affected by the presence of glucose in the culture medium, but which had increased levels of expression in the presence of xylan, xylobiose and sophorose. On the other hand, the production of xylanase *xyn 1* was subjected to full repression when only glucose was present in the medium as a carbon source.

Although low activities of xyloglucanases,  $\beta$ -xylosidases and mannanases were detected, the presence of these enzyme activities is important in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. Because the cellulose fibers are linked with other types of polysaccharides, accessory enzymes are needed to ensure the exposure of the cellulose. Among these polysaccharides is the xyloglucan, which is intimately connected to these fibers. Xyloglucanases are required to facilitate the access of cellulases. The  $\beta$ -xylosidases are important when the complete hydrolysis of xylan is required, for removing  $\beta$ -xylosyl residues at the nonreducing terminal region of xylobiose and xylooligosaccharide, which is an essential process to minimize the inhibition by the final product of endoxylanases for the complete hydrolysis of xylan. The group of enzymes belonging to the mannanases act mainly on structures called mannans and galactomannans. The  $\beta$ -mannanases (endo-1,4- $\beta$ -mannanases) attack internal glycosidic bonds of the structural chains of mannan, generating short-chain  $\beta$ -1,4-mannoooligosaccharides. Meanwhile,  $\beta$ -mannosidases generate mannose as part of oligosaccharides, cleaving mannobiose in units of mannose [32].

In the literature, *Trichoderma reesei* is cited as one of the best secreting hemicellulases, producing high concentrations of most hemicellulases already described for microorganisms [33]. In *A. niger* and *T. reesei*, exposure to xylose induces the genes for hemicellulases, as well as enzymes involved in the utilization of xylose (xylose reductase and D-xylulokinase), although levels above 1 mmol/L have the opposite effect [34].

The results obtained in this work for celluloses and hemicellulases are in agreement with the results obtained by Ribeiro et al. [35], who assessed the secretome of the mutant 9A02S1 in SCB. In that study, the authors found that the enzymatic repertoire of *P. echinulatum* is primarily to produce enzymes of the cellulose complex (endoglucanases, cellobiohydrolases, and  $\beta$ -glucosidases). In addition, other important glycosyl hydrolase for

strategies to convert biomass to biofuels were identified, including xylanases, hemicellulases and pectinases.

### *3.4 Enzymatic activity in pectin substrates*

#### *3.4.1 Pectinases*

The data presented in Fig. 6 show that *P. echinulatum* has pectinase activity; however, compared with other enzymatic activities, pectinase activities were reduced. With the pectin substrate, enzyme titers did not exceed the range of 0.2 IU/mL at 120 h of cultivation, when the S1M29 strain was grown on SCB (Fig. 6B). Culture with the 2HH strain showed similar activity to the mutant strain, and the medium prepared with glycerol was better than the others, achieving greater enzymatic titers at 48 and 96 h cultivation (Fig. 6A).

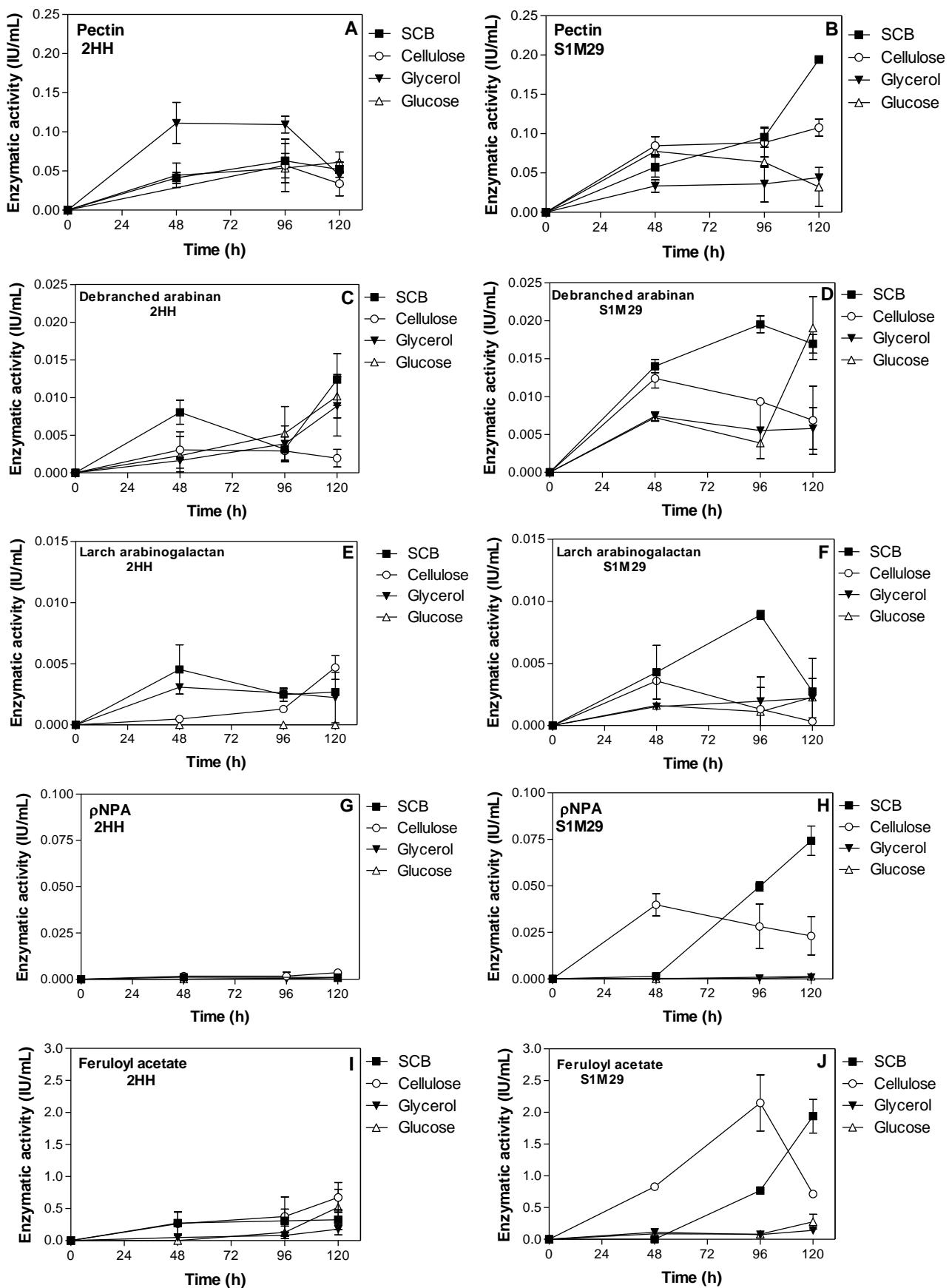
#### *3.4.2 Arabinnanases*

Activities of arabinnanases (Fig. 6), enzymes involved in pectin side chains structures such as rhamnogalacturonan I, detected in broths secreted by the strains used in this study, were also low. Analyzing the substrates debranched arabinan (Figs. 6C – 6D) and arabinan (supplementary material) used, the maximum activities are detected in a range between 0.017 and 0.020 IU/mL (for S1M29 strain) and between 0.009 and 0.012 IU/mL (for 2HH strain) when both strains were grown in SCB.

The enzyme broths of 2HH and S1M29 provided inefficient hydrolysis of larch arabinogalactan substrate (Fig. 6E-6F). The highest enzymatic activity for that substrate was 0.009 IU/mL for the S1M29 strain and 0.005 IU/mL for 2HH, when both strains were grown in SCB.

When the substrate pNPA was employed, the variation in production of arabinofuranosidase between strains is visible. The enzymatic broth produced by the 2HH strain showed no activity (Fig. 6G). However, the enzymes produced by the S1M29 strain showed increased activity on the substrate when SCB was used as the carbon source, reaching  $0.074 \pm 0.008$  IU/mL. The culture medium with cellulose also showed higher activities, around  $0.04 \pm 0.006$  IU/mL, but at 48 h of cultivation (Fig. 6H).

The strains of *P. echinulatum* used in this study were less efficient in degrading pectin. Studies should be conducted with this species of fungus using other carbon sources to induce pectinases, which may present higher enzymatic bonds. The fungus *A. niger* is reported as a good producer of pectinolytic enzymes. Martens-Uzunova and Schaap [36] found that 60 of



**Fig.6.** Pectinases (A – B), arabinanases (C – F), arabinofuranosidase (G – H) and esterases (I – J) secreted by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* in submerged cultures using different carbon sources.

the genes identified in the genome of *A. niger* are predicted to encode pectinolytic enzymes, and the expression of 46 was detected. Similar studies were conducted [37] with *Aspergillus flavipes* FP50, using different carbon sources to produce pectinolytic enzyme, and found that some pectinase were produced at basal level in sources such as glucose, glycerol, and xylose, while others only in the presence of specific inducers such as citrus pectin and polygalacturonic acid.

In the process of degrading plant cell walls, the action of supplementary enzymes such as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases is essential because cleave  $\alpha$ -L-arabinofuranosidic bonds and act synergistically with other hemicellulases and pectic enzymes for complete hydrolysis of hemicelluloses and pectins [38]. Ioannes et al. [39] in a study conducted with *Penicillium purpurogenum*, detected the highest titers of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (1.0 IU/mL) when L-arabitol was used as carbon source. The enzymatic titers of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase secreted by *P. echinulatum* were low when compared to the work cited, showing a deficiency in production of the enzyme, at least when grown on cellulose based substrates.

### 3.5 Feruloyl esterases activity

The S1M29 strain secreted feruloyl acid esterase around  $2.14 \pm 0.626$  IU/mL and  $1.94 \pm 0.461$  IU/mL with cellulose or SCB as carbon sources, respectively, at 96 and 120 h of cultivation (Fig. 6J), with no statistical differences ( $p>0.05$ ). Lower feruloyl esterase activity were detected in media with glucose or glycerol in relation to media formulated with cellulose or SCB, in culture with both 2HH and S1M29 strains. In culture with the 2HH strain, the activities were low in all used culture medium (Fig. 6I).

In the literature, many microorganisms are reported as producers of feruloyl esterases; however, species of the genus *Aspergillus* are the most active producers of this enzyme. Ou et al. [40], in a study involving the production of feruloyl esterases by *A. niger* in solid-state culture with wheat bran supplemented with corn bran and ammonium sulfate, detected 7.68 mU/g of activity this enzyme in 72 h. In this context, the S1M29 strain of *P. echinulatum* shows promise for the production of feruloyl esterases, since the activities achieved when cellulose was used as carbon source at 96 h were relatively high.

### 3.6 Amylase activity

The activities of amylase detected in this work were significantly reduced (supplementary material). In both strains assays, the activities were below 0.15 IU/mL, with the exception the S1M29 strain grown in the medium formulated with glucose, which had a

peak detected of  $0.93 \pm 0.182$  IU/mL at 48 h of cultivation, suggesting that amylolytic system of this fungus is constitutive.

#### **4. Conclusion**

This study showed that the enzyme complex of *P. echinulatum*, mainly from S1M29 strain, has various hydrolases including esterases that are involved in the degradation and modification of various polymers, thus forming an enzymatic complex with the potential to hydrolyze lignocellulosic complexes. The culture medium prepared with cellulose or SCB in most of the used substrates had higher enzymatic activities, except for Avicel® and pectin, where the greater activity was in glycerol, and laminarin, with higher activity in glucose, when the 2HH strain was employed. Laminarin, pNPC, pNPG and starch substrates lead to the highest enzymatic activity when the S1M29 strain was grown on glucose. In general, it was verified that have not direct correlation between the mycelial mass and enzymatic activities.

#### **Acknowledgments**

The authors thank the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Laboratory of Science and Technology of Bioethanol (CTBE) and University of Caxias do Sul (UCS). This research was supported by grants from the São Paulo Research Foundation - FAPESP (2008/58037-9) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) of Brazil (310177/2011-1).

#### **References**

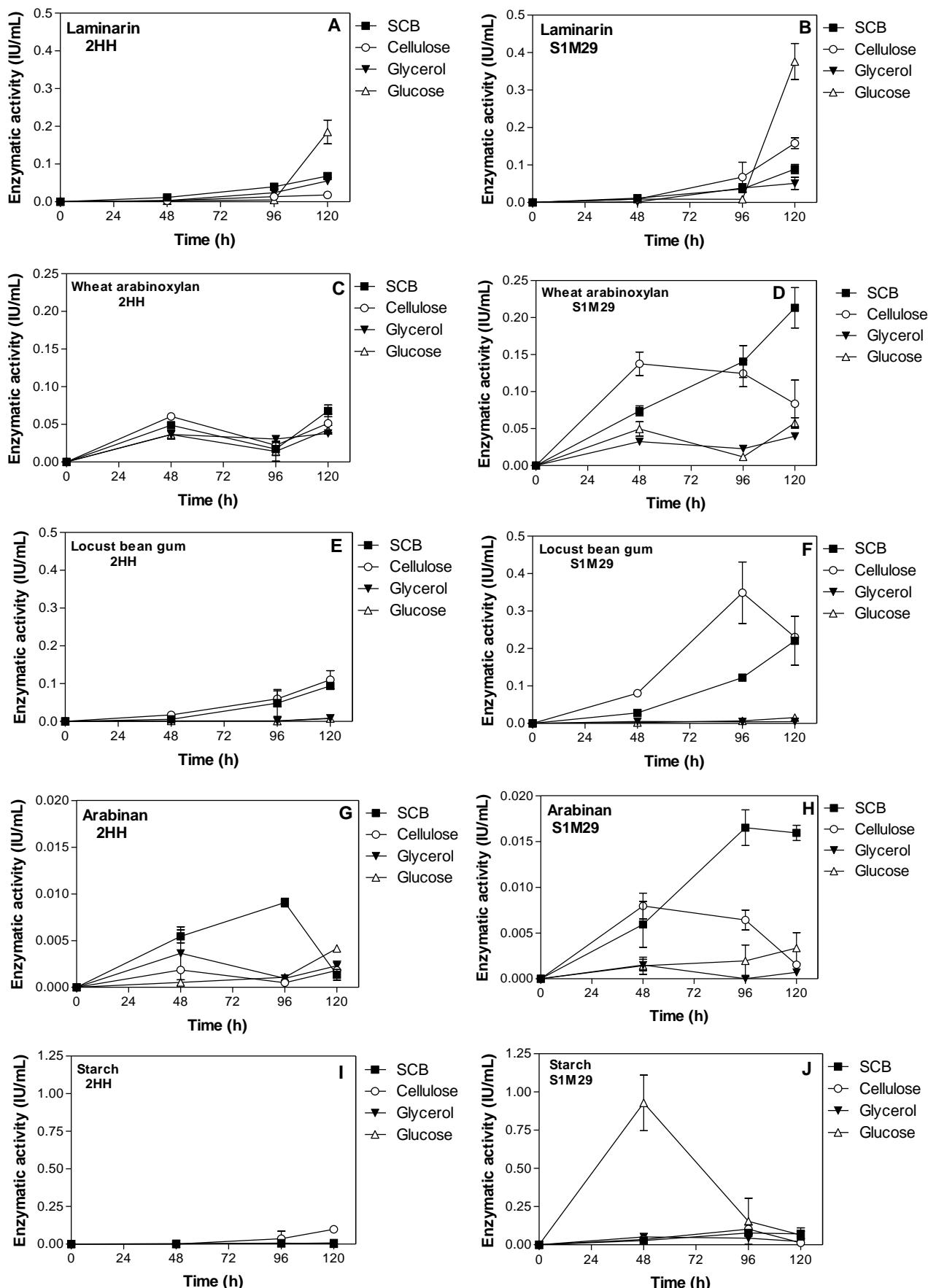
- [1] Rostagno MA, Prado JM, Mudhoo A, Santos DT, Forster-Carneiro T, Meireles MA. Subcritical and supercritical technology for the production of second generation bioethanol. *Crit Rev Biotechnol* 2014.
- [2] Cateto C, Hu G, Ragauskas A. Enzymatic hydrolysis of organosolv Kanlow switchgrass and its impact on cellulose crystallinity and degree of polymerization. *Energy & Environmental Science* 2011;4:1516-1521.
- [3] Ndaba B, Chiyanzu I, Marx S, Obiero G. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* on the co-fermentation of sweet sorghum bagasse hydrolysates pretreated under varying conditions. *Biomass and Bioenergy*.

- [4] Lo Y-C, Saratale GD, Chen W-M, Bai M-D, Chang J-S. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology* 2009;44:417-425.
- [5] Popper ZA, Michel G, Herve C, Domozych DS, Willats WG, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* 2011;62:567-590.
- [6] Wongwilaiwalin S, Rattanachomsri U, Laothanachareon T, Eurwilaichitr L, Igarashi Y, Champreda V. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme and Microbial Technology* 2010;47:283-290.
- [7] Galazka JM, Cate JHD. Improving the bioconversion of plant biomass to biofuels: A multidisciplinary approach. *Energy & Environmental Science* 2011;4:3329-3333.
- [8] van den Brink J, de Vries RP. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91:1477-1492.
- [9] Karnaouri A, Topakas E, Antonopoulou I, Christakopoulos P. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. *Front Microbiol* 2014;5:281.
- [10] Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Ann Rev Plant Biol* 2010;61:263-289.
- [11] Glass NL, Schmoll M, Cate JH, Coradetti S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annu Rev Microbiol* 2013;67:477-498.
- [12] Koseki T, Takahashi K, Handa T, Yamane Y, Fushinobu S, Hashizume K. N-linked oligosaccharides of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase are important for thermostability and catalysis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:2476-2480.
- [13] Kovács K, Megyeri L, Szakacs G, Kubicek CP, Galbe M, Zacchi G. Trichoderma atroviride mutants with enhanced production of cellulase and  $\beta$ -glucosidase on pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology* 2008;43:48-55.
- [14] Gusakov AV, Sinitsyn AP. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. *Biofuels* 2012;3:463-477.
- [15] Camassola M, Dillon AJ. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:1889-1900.
- [16] Dillon AJ, Bettio M, Pozzan FG, Andrichetti T, Camassola M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *J Appl Microbiol* 2011;111:48-53.

- [17] Dillon AJ, Zorgi C, Camassola M, Henriques JA. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and beta-glucosidase activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;70:740-746.
- [18] Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol* 1957;73:269-278.
- [19] Novello M, Vilasboa J, Schneider WDH, Reis LD, Fontana RC, Camassola M. Enzymes for second generation ethanol: exploring new strategies for the use of xylose. *RSC Advances* 2014;4:21361-21368.
- [20] Cota J, Alvarez TM, Citadini AP, Santos CR, de Oliveira Neto M, Oliveira RR, Pastore GM, Ruller R, Prade RA, Murakami MT, Squina FM. Mode of operation and low-resolution structure of a multi-domain and hyperthermophilic endo-beta-1,3-glucanase from *Thermotoga petrophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406:590-594.
- [21] Camassola M, Dillon AJP. Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. vol. doi:10.4172/scientificreports.125; 2012.
- [22] Bailey MJ, Tahtiharju J. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;62:156-162.
- [23] Schneider WD, Dos Reis L, Camassola M, Dillon AJ. Morphogenesis and Production of Enzymes by *Penicillium echinulatum* in Response to Different Carbon Sources. *Biomed Res Int* 2014;2014:254863.
- [24] Sternberg D, Dorval S. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnol Bioeng* 1979;21:181-191.
- [25] Juhász T, Szengyel Z, Réczy K, Siika-Aho M, Viikari L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* 2005;40:3519-3525.
- [26] Ilmen M, Saloheimo A, Onnela ML, Penttila ME. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1298-1306.
- [27] Delabona Pda S, Farinas CS, da Silva MR, Azzoni SF, Pradella JG. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresour Technol* 2012;107:517-521.

- [28] Reis L, Schneider W, Fontana R, Camassola M, Dillon AP. Cellulase and Xylanase Expression in Response to Different pH Levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 Medium. *BioEnergy Research* 2013;1-8.
- [29] Zampieri D, Guerra L, Camassola M, Dillon AJP. Secretion of endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. *Industrial Crops and Products* 2013;50:882-886.
- [30] Seyis I, Aksoz N. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2005;55:115-119.
- [31] Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M, Kubicek CP. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol* 1996;21:1273-1281.
- [32] Rose SH, Trollope K, Gorgens JF. Fungal  $\beta$ -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Proc Biochem* 2010;45:11-11.
- [33] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EG, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barabote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* 2008;26:553-560.
- [34] Mach-Aigner AR, Pucher ME, Mach RL. D-Xylose as a repressor or inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Environ Microbiol* 2010;76:1770-1776.
- [35] Ribeiro DA, Cota J, Alvarez TM, Bruchli F, Bragato J, Pereira BM, Pauletti BA, Jackson G, Pimenta MT, Murakami MT, Camassola M, Ruller R, Dillon AJ, Pradella JG, Paes Leme AF, Squina FM. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. *PLoS One* 2012;7:e50571.
- [36] Martens-Uzunova ES, Schaap PJ. Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. *Fungal Genet Biol* 2009;46 Suppl 1:S170-s179.

- [37] Martínez-Trujillo A, Aranda JS, Gómez-Sánchez C, Trejo-Aguilar B, Aguilar-Osorio G. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology* 2009;40:40-47.
- [38] Numan MT, Bhosle NB. Alpha-L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33:247-260.
- [39] Ioannes PD, Peirano A, Steiner J, Eyzaguirre J. An  $\alpha$ - L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. *Journal of Biotechnology* 2000;76:253-258.
- [40] Ou S, Zhang J, Wang Y, Zhang N. Production of Feruloyl Esterase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation on Different Carbon Sources. *Enzyme Research* 2011;2011:4.



**Supplementary material.** Endoglucanases (A – B), xylanases (C – D), mannanases (E – F), arabinanases (G – H) and amylase activities (I – J) of wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* in submerged cultures using different carbon sources.

## Secretome analysis of *Penicillium echinulatum* strains reveals its potential for degradation of lignocellulosic biomass

Willian Daniel Hahn Schneider<sup>1†</sup>, Thiago Augusto Gonçalves<sup>2†</sup>, Cristiane Akemi Uchima<sup>2</sup>, M. Brian Couger<sup>3</sup>, Rolf Prade<sup>3</sup>, Fabio Marcio Squina<sup>2</sup>, Aldo José Pinheiro Dillon<sup>1</sup>, Marli Camassola<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Enzymes and Biomass Laboratory, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.*

<sup>2</sup>*Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory – CTBE, Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, Pólo II de Alta Tecnologia, Caixa Postal 6192, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil.*

<sup>3</sup>*Department of Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, 1110 South Innovation Way. Stillwater, OK, 74078 USA.*

(†). These authors contributed equally to this work.

(\*). Corresponding author: Tel./fax: +55 54 3218 2681

E-mail address: [mcamassola@gmail.com](mailto:mcamassola@gmail.com) (M. Camassola)

### Abstract

#### Background

The enzymatic degradation of lignocellulosic materials by fungal enzyme systems has been extensively studied due to its effectiveness in the liberation of fermentable sugars for bioethanol production. Recently, *Penicillium echinulatum* has been described as a great producer of cellulases and considered promising strain for the bioethanol industry.

#### Results

*P. echinulatum*, wild type 2HH and its mutant strain S1M29, were grown on different carbon sources: cellulose, sugar cane bagasse pretreated by steam explosion, glucose and glycerol during 120 hours. Samples of 96 hours were collected for enzymatic measurement and secretome analysis by 1D-PAGE LC-MS/MS. A total of 165 proteins were identified and more than one-third of the proteins belong to CAZy families. Glycosyl hydrolases (GHs) are the most abundant group, being represented in larger quantities by GH3, 5, 17, 43 and 72. Cellobiohydrolases, endoglucanases, β-glycosidases, xylanases, endoxylanases, β-xylosidases and mannanases were found and, in minor quantities, pectinases, ligninases and amylases.

Swollenin and esterases were also identified. In addition, many proteins related to the degradation of fungal cell wall were found in the secretome of *P. echinulatum*, such as chitinases, glucanases, phospholipases and some proteases.

## Conclusions

Our study revealed differences in the two strains of *P. echinulatum* in several aspects in which the mutation improved the production of enzymes related to biomass deconstruction. Considering the spectral counting, the mutant strain S1M29 was more efficient in the production of enzymes involved in cellulose and hemicellulose degradation. Moreover, S1M29 produces more protein on SCB than on cellulose, relevant information when considering the production of cellulases using raw materials at low cost. Glucose, and especially glycerol, were used mainly for the production of amylases, ligninases and fungal cell wall degrading enzymes.

## Keywords

Lignocellulosic biomass, biofuels, *Penicillium echinulatum* strains, secretome, CAZymes.

## 1. Introduction

One of the global priorities is the development of an alternative energy sources other than fossil fuels and the use of cellulosic biomass has the potential to contribute to meeting the demand for liquid fuel [1]. Lignocellulose is the most abundant natural material present on earth and is composed of the polyphenol lignin and three polysaccharides, cellulose, hemicellulose, and pectin. In combination with plant cell wall-associated enzymes, structural proteins, and proteoglycans [2], these components are strongly intermeshed and chemically bonded by non-covalent forces and covalent crosslinkages, forming an intricately linked network that provides strength and durability to the plant cell wall [3].

However, saccharification and bioproduct manufacturing from lignocellulose biomass are complex and lengthy process [4]. One approach to depolymerization of plant cell wall polysaccharides involves using hydrolytic enzymes produced by some species of bacteria and fungi [5]. The degradation of lignocellulosic materials into monomeric sugars is of major importance, since the fermentable sugars can be used as raw materials in many biotechnological processes, including the production of second generation ethanol [6]. In nature, fungi perform a major role in the degradation of plant biomass, producing an extensive set of carbohydrate degrading enzymes specifically dedicated to breakdown plant cell wall polysaccharides. However, these different sets differ between the species of fungi and the

carbon sources employed. For example, while *Trichoderma reesei* has a set of highly efficient enzyme in the degradation of cellulose [7, 8], *Aspergillus* species produce many enzymes for degrading pectin [9].

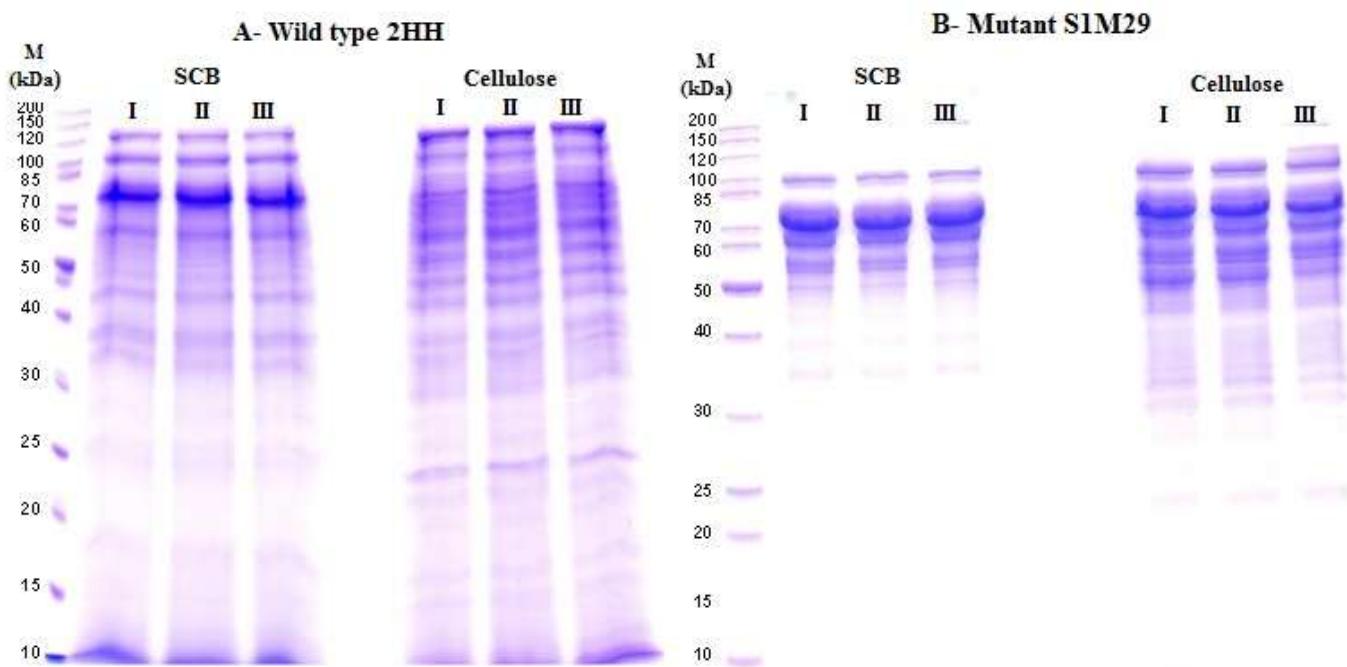
*Penicillium* species have been reported to produce enzyme systems with higher performance than *T. reesei* and *A. niger* [10]. Among the species of *Penicillium*, *P. echinulatum* has been focus of attention because of its potential to produce high titers of cellulases and has been considered a promising strain for the industry of second-generation ethanol [11-18]. All the mutant strains used for the production of cellulases are from the wild type called 2HH that was isolated from larvae of coleoptera *Anobium punctatum*. A mutant strain of *P. echinulatum* 9A02S1 was obtained from the strain 2HH, after several steps of mutagenesis, characterized by being a mutant partially derepressed by glucose. This microorganism is deposited in the Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen - DSM 18942. The mutant strain S1M29 of *P. echinulatum* was obtained from 9A02S1 strain through employing hydrogen peroxide mutagenesis and selection of mutants in medium supplemented with 2-deoxyglucose [12].

In this context, it is important to study the secretome of *P. echinulatum* strains, since the genetic improvement process of these organisms are unknown. In this paper, we searched to shed light to this question through the secretome level. This paper presents the first study of wild type 2HH and mutant S1M29 secretomes of *P. echinulatum* in submerged cultivation using sugar cane bagasse pretreated by steam explosion (SCB), cellulose, glucose and glycerol as carbon sources. To supplement this study, an enzymatic analysis using a set of substrates was conducted in order to further validate and describe the enzymatic repertoire available to degrade plant biomass by *P. echinulatum*.

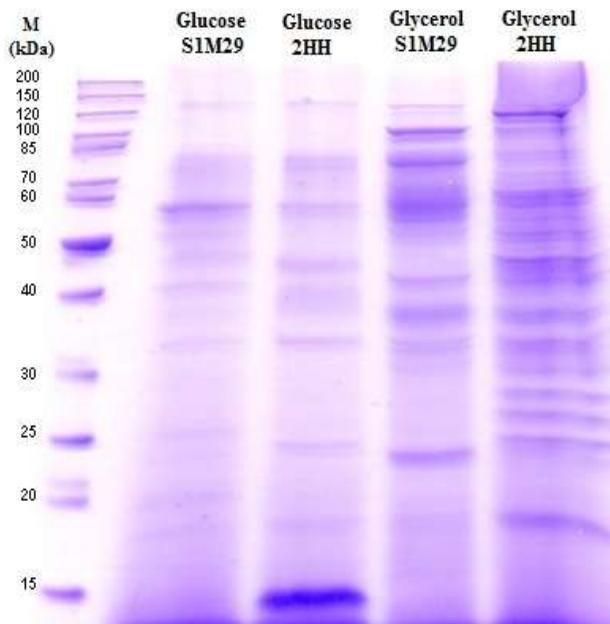
## 2. Results

### 2.1 Electrophoretic profile of *P. echinulatum*

The analysis of the gels (1-D PAGE) of total proteins secreted by both strains of *P. echinulatum* grown on SCB, cellulose, glucose and glycerol, after 96 h of culture, shows the diversity of molecular masses of proteins (Figure 1-2). It's possible to see differences in the level of some proteins that appear in greater quantity in the mutant strain S1M29 (Figure 1B) than in the wild type 2HH (Figure 1A) when grown on cellulose or SCB, which is evidenced by proteomic data. On the other hand, protein bands of higher molecular weight (~ 120 kDa) are displayed only in the wild type.



**Figure 1** Electrophoretic profile of *Penicillium echinulatum* grown on SCB and cellulose at 96h. On the left (A), 1-D PAGE of wild type 2HH and on the right (B) 1-D PAGE of the mutant strain S1M29. I, II and III refer to triplicate. M – molecular marker, kDa – molecular weight.



**Figure 2** Electrophoretic profile of *Penicillium echinulatum* grown on glucose and glycerol at 96h. One replicate for glucose and glycerol was performed and profiles of wild type 2HH and mutant S1M29 are shown intercalary in the gel above. M – molecular marker, kDa – molecular weight.

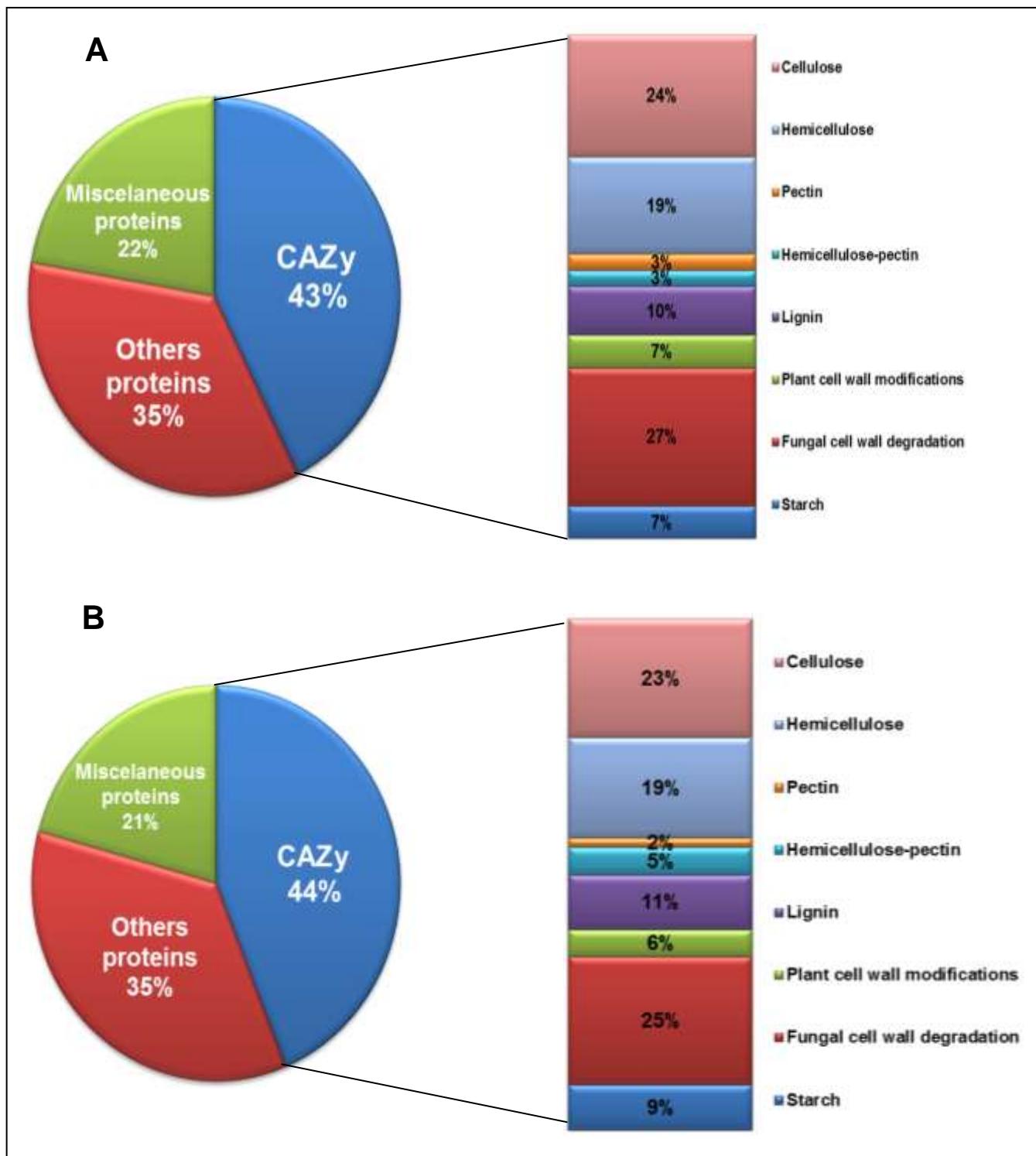
The analysis of electrophoretic profiles of both strains of *P. echinulatum* grown on glucose or glycerol (Figure 2) also reveals a significant number of bands with different molecular weights. However, the bands do not appear so intensely when compared with SCB or medium formulated with cellulose, which clearly indicates that the secretion of proteins varies according to the carbon source.

## 2.2 Profiling of the *P. echinulatum* secretome for lignocellulose degradation

The set of proteins found in secretome of both strains have a molecular weight in the range between 11 and 123 kDa. In the secretomic analysis of wild type 2HH and mutant S1M29 from *P. echinulatum* 165 proteins were found. In total, 36 proteins are exclusive from wild type, 18 proteins are exclusive from the mutant and 111 are common in both strains. Using bioinformatics tools to predict signal peptide, it has been found that 117 proteins (71%) of the identified proteins are predicted to contain signal peptide and are secreted.

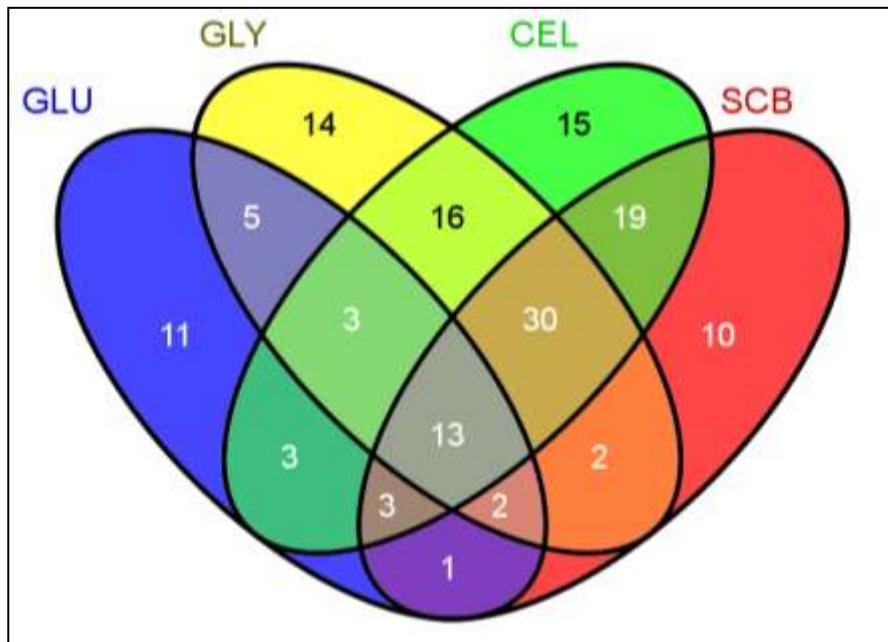
The main objective of this work was to find enzymes involved in the degradation of lignocellulosic biomass. From 147 proteins found in the wild type, 63 proteins (~ 43%) belonged to families described in the CAZy database [19]. Similarly, 57 proteins (~ 44%) from 129 proteins found in the mutant, belonged to families in the CAZy database.

Among the proteins found in the secretome of the wild type and mutant, cellulases, hemicellulases and fungal cell wall degradation enzymes were the majority enzymes, accounting for over 50% of the identified proteins (Figure 3A-B). However, cellulases correspond to enzymes that were more expressed, according to the spectral counting analysis.



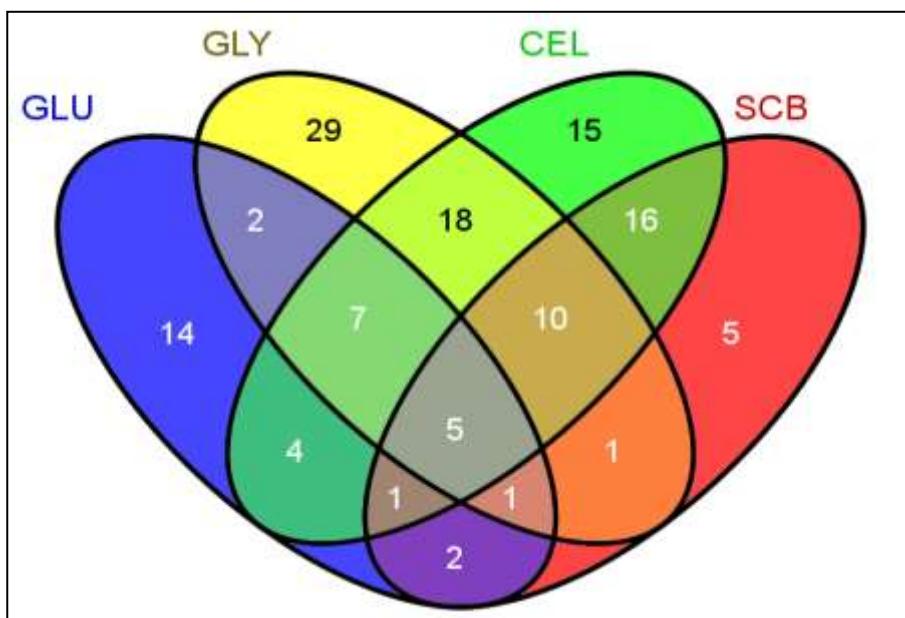
**Figure 3 Distribution of proteins identified in secretome of *Penicillium echinulatum* strains.** The proteins were classified according to CAZy database. The CAZy families identified in the wild type are representing in (A) and (B) representing the CAZy families identified in the mutant.

Regarding the secretome profile found in wild type 2HH of *P. echinulatum* the largest number of proteins were found in the medium formulated with cellulose (102 proteins, 15 exclusive), followed by glycerol (85 proteins, 14 exclusive) SCB (80 proteins, 10 exclusive) and glucose (41 proteins, 11 exclusive). Of the 147 proteins found in the secretome of wild type, 13 were found in all four different culture media (Figure 4).



**Figure 4 Venn diagram of secretome from *Penicillium echinulatum* wild type 2HH.** Distribution of 147 proteins identified in the secretome of wild type, exclusive in each carbon source or shared between them. GLU – glucose, GLY – glycerol, CEL – cellulose and SCB – sugar cane bagasse. The venn diagram was prepared by means of tool Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

In secretome profile of mutant strain S1M29 of *P. echinulatum*, the larger number of proteins was found again in the medium formulated with cellulose (76 proteins, 15 exclusive). Glycerol appears in the sequence with 73 proteins identified and it has the greatest number of exclusive proteins (29). The medium formulated with SCB comes in third place (41 proteins, 5 exclusives), followed by glucose (36 proteins, 14 exclusives). Of the 129 proteins found in the secretome of the mutant strain, five were found in all four different culture media (Figure 5).

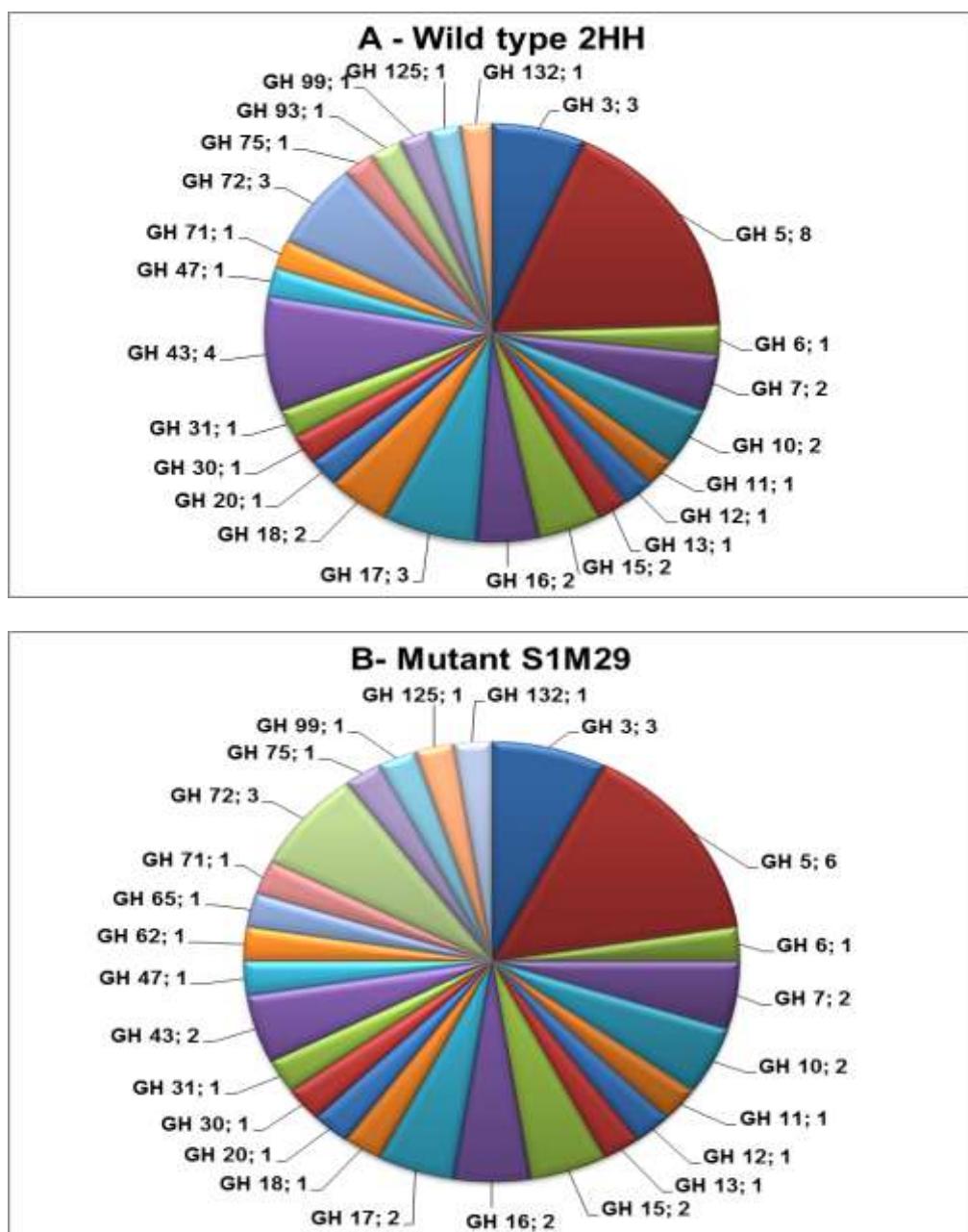


**Figure 5 Venn diagram of secretome from *Penicillium echinulatum* mutant S1M29.** Distribution of 129 proteins identified in the secretome of mutant strain, exclusive in each carbon source or shared between them. GLU – glucose, GLY – glycerol, CEL – cellulose and SCB – sugar cane bagasse. The venn diagram was prepared by means of tool Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

Among 36 proteins found only in the wild type secretome, some have glycosyl hydrolase (GH) function, such as exo- $\beta$ -1,3-glucanase (GH5),  $\beta$ -1,3-glucanase (GH17), that were found exclusively in glucose, and chitinase (GH18) that was found only in glycerol (Table 7). In addition, endo- $\beta$ -1,4-glucanase (GH5) (Table 1) and  $\beta$ -xylosidase (GH43) were found in cellulose or SCB (Table 2), and exo- $\alpha$ -L-1,5-arabinanase (GH93) that was present only in cellulose (Table 3). Carbohydrate acetyl esterase (CE16) (Table 8) and cellulose monooxygenase (AA9) were also detected (Table 1). Some hypothetical and adhesion proteins, proteases, lipases, among others were also found in the secretome of *P. echinulatum* wild type (additional file 1).

Concerning the mutant strain secretome, 18 exclusive proteins were identified, among these also enzymes with GH function, such as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (GH62), found only in SCB and cellulose (Table 4) and  $\beta$ -1,6-glucanase (GH30) (Table 7). Esterases, such as acetyl xylan esterase (CE1) (Table 2), and enzymes related to the depolymerization of lignin (Table 5) were identified. The other exclusive proteins found refer to ribosomal, hypothetical and adhesion proteins, lipases and proteases/peptidases (additional file 1). Most of the proteins identified as exclusives in the secretome of the wild type 2HH and the mutant strain S1M29 have a low number of spectral countings, which generates some bias analyzes maybe due to differences in length of protein, the molecular weight and ionization efficiency [20].

Among the proteins belonging to the CAZy database in the wild type 2HH, it was found 45 proteins grouped in 24 different families of GHs (Figure 6A), amongst, with the largest number of spectra are cellobiohydrolases I and II (GH7 and GH6), endoglucanases (GH5 and GH7) and xylanase (GH10). These enzymes were basically identified only in the media formulated with SCB or cellulose. In the secretome profile of the mutant S1M29, 57 proteins belong to CAZy families and once again, GHs were the most abundant (41 proteins grouped into 25 families), as can be seen in Figure 6B.



**Figure 6 Distribution of GHs families in *Penicillium echinulatum* secretome.** The proteins were classified according to CAZy database. A- GHs identified in wild type 2HH, B- GHs identified in mutant S1M29.

Among CAZymes found in common with the wild type, there were a greater number of spectra found in the mutant comparing with the wild type, as can be seen especially in Table 1 and 2. It happened with cellobiohydrolase I and II (GH7 and GH6), endoglucanase 1 and Cel5C endoglucanase (GH5), xylanase (GH10). In addition, these enzymes have been found with a higher number of spectra in SCB and cellulose.  $\beta$ -glucosidase I (GH3) was identified with a greater number of spectra in glycerol medium, being this number also larger in the mutant strain (Table 1). However, another protein related to  $\beta$ -glucosidase was found in the wild type with considerable amount of spectra in cellulose.

The number of spectra for exo- $\beta$ -1,3-glucanase (GH17) in both strains cultivated in glucose is relatively much larger than have been identified in other carbon sources, especially in wild type (Table 7), and is related to the degradation of the fungal cell wall. Other GHs found in the wild type with larger spectra in glucose and glycerol than in SCB and cellulose which are also related to the degradation of the fungal cell wall (Table 7) were chitin glucanosyltransferase (GH16), chitosanase (GH75) and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase (GH3). The presence of lysophospholipase phospholipase B (additional file 1) with more number of spectra in the wild type, especially in medium prepared with glucose or glycerol, is a further indication of the arsenal of enzymes produced by the wild type for the degradation of fungal cell wall.

Other enzymes with GH function found in both strains, however, with a reduced number of spectra were putative endoxylanase (GH30),  $\alpha$ -mannosidase (GH47), with the largest number of spectra in glycerol;  $\beta$ -1,4-mannanase (GH5), found in SCB and cellulose;  $\beta$ -xylosidase (GH3), found only in the media formulated with cellulose, in both strains (Table 2). Distinct endoglucanases (GH5 and GH12) were expressed differently in the culture media, GH5 with more spectra in glucose, whereas GH12 in SCB and cellulose (Table 1).

The presence of enzymes related to starch degradation were also found in both strains, although with a lower number of spectra, as the case of  $\alpha$ -amylase (GH13),  $\alpha$ -glucosidase (GH31) and two glucoamylases (GH15), being the latter identified only when glucose or glycerol was used as carbon source (Table 6).

Six carbohydrate esterases were identified in both strains, with reduced number of spectra, grouped in four different families, including carboxylesterases (CE10), homoserine acetyltransferase (CE1), carbohydrate acetyltransferase (CE16) (Table 8) and acetyl xylan esterase (CE1 and CE5) (Table 2).

The same families of auxiliary redox enzymes which act together with the CAZymes, such as cellulose monooxygenase (AA9), were also found. While in the wild type cellulose

monooxygenase Cel61A (AA9) was present only in the medium prepared with SCB, in the mutant strain it appeared with a greater number of spectra in the medium prepared with cellulose as well. However, the secretome analysis of wild type indicates another possible candidate for cellulose monooxygenase, again identified only in SCB.

It was verified the presence of only one polysaccharide lyase, the pectin lyase (PL1) and one exo-arabinanase (Table 3). Arabinofuranosidase were also found in less quantity (Table 4).

The secretome analysis has shown that approximately 30% of the identified CAZymes have carbohydrate-binding module (CBMs). It was identified 8 different CBM families, being the CBM1 the most abundant. In the case of endoglucanase Cel5C (GH5), two CBMs were found attached to the same CAZyme, CBM46 and CBM1, and also two CBMs for swollenin, CBM63 and CBM1 (Table 1).

The presence of xylose reductase in both strains grown in SCB and cellulose indicates the potential of these broths for enzymatic production of xylitol and/or to facilitate the conversion of xylose to ethanol by other microorganisms (additional file 1). Xylulose reductase was also found (Table 2), but this enzyme doesn't participate to conversion of xylose to xylulose for ethanol production [21].

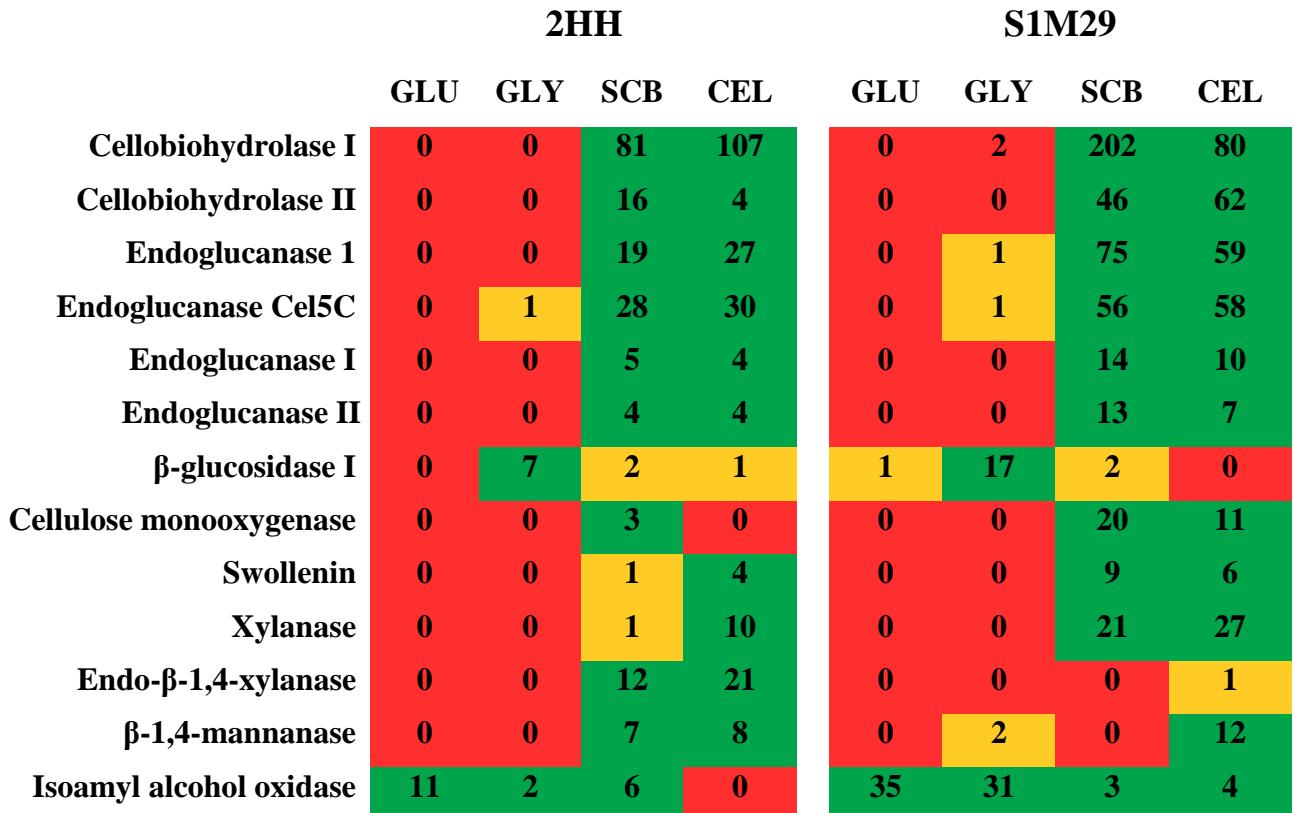
Some enzymes involved in the degradation of lignin were detected. In the secretome of mutant strain, isoamyl alcohol oxidase (AA7) was found in a large number of spectra in glucose and glycerol. GMC oxidoreductase (AA3), enzyme which acts both in cellulose and lignin – possibly related to cellobiose dehydrogenase [22, 23] – was found in the medium with glycerol (Table 1). Manganese superoxide dismutase and glutathione S-transferase (additional file 2) were also identified.

In Figure 7 is presents the main differences between the secretome of wild type and mutant, regarding the identification of key proteins in the lignocellulosic biomass degradation. In the figure it is clearly shown that difference, i.e., the expression of many of these enzymes, particularly by the mutant. The expression of cellobiohydrolases, endoglucanases and xylanase reveal the mutant S1M29 potential for biomass hydrolysis.

In the medium elaborated with SCB and cellulose, the mutant strain S1M29 showed the highest spectra numbers of enzymes related with the cellulose (GH5, GH6 and GH7) and hemicellulose (GH10) degradation. These enzymes were identified with higher percentage in the medium elaborated with SCB (~77%) than cellulose (~29%).

However, for the wild type, it is noted that the medium prepared with cellulose was better inducer of cellulose and hemicellulose degrading enzymes than the SCB medium. For

cellulose it was verified ~39% of enzymes belonging to CAZymes, while for SCB, it was found ~26% of these enzymes.



**Figure 7 Heat map showing the difference between the two strains of the major lignocellulolytic enzymes identified in the secretome.** The color of each enzyme related to spectra abundance in the different growth conditions (GLU- glucose, GLY – glycerol, SCB – sugar cane bagasse, CEL – cellulose), varying from a minimum (red) to maximum (green) abundance.

### 2.3 Enzymatic analysis of the *P. echinulatum* secretome

To further validation of proteomic data, the hydrolytic potential of enzymatic broths from wild type 2HH and mutant S1M29 strains were assessed using 13 different substrates. Some results of Figure 8 are shown in another work, in the form of absolute enzymatic

activity (unpublished data). However, due to proteomic analysis, part of these data is presented here in specific enzymatic activity form.

The highest activity of  $\beta$ -glucosidases (Figure 8A-B), using the substrate  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ( $\rho$ NPG) was found for both strains, in the media elaborated with glucose or glycerol, what is according to the proteomic data. The largest number of spectra for cellobiohydrolases were found in the media formulated with SCB or cellulose, mainly in mutant broths (Table 1). However, the activity of cellobiohydrolases, dosed with  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside ( $\rho$ NPC) (Figure 8A), did not show this difference, since for the wild type strain the highest activity was detected in the medium prepared with glycerol, whereas in the mutant (Figure 8B), the activity of glycerol is similar to SCB and cellulose; i.e. the results of this specific activity are not in accordance with the spectra found in these carbon sources. This can be explained by the proteomic approach performed in media prepared with glucose or glycerol has one replicate.

It may also explain the high activity endoglucanases in medium containing glucose or glycerol when the substrate carboxymethyl cellulose (CMC) was used. However, when the substrate lichenan has been employed, the specific activity was higher in media prepared with SCB or cellulose, for both strains, which agree with proteomics data (Figure 8C-D).

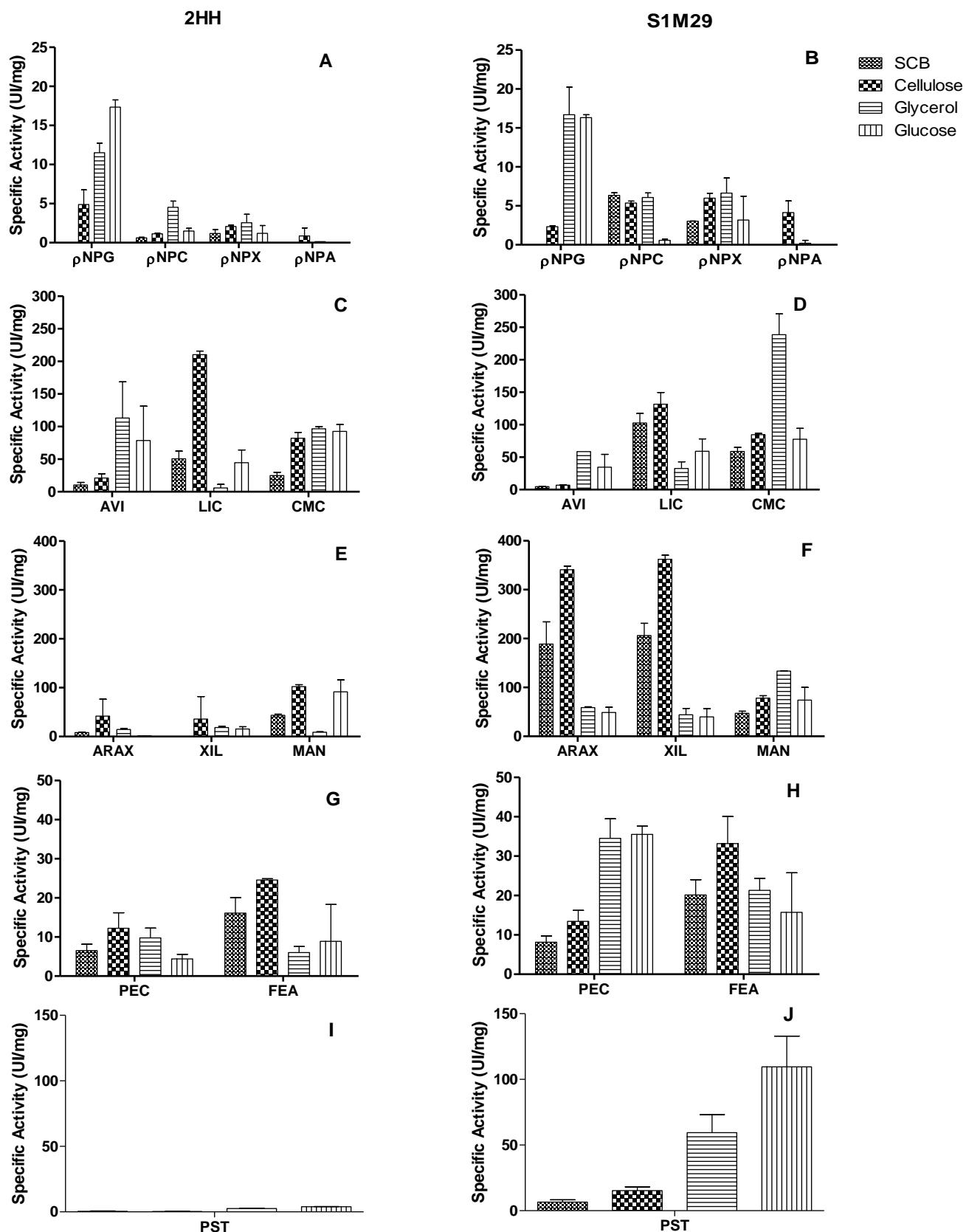
Still, taking into account that different endoglucanases were found and the substrates used for its determination were not specific for each of them. In the case of lichenan substrate, the third highest activity found in both strains was in the media prepared with glucose. By analyzing the proteomics table (Table 1), an endo- $\beta$ -1,4-glucanase was found in the secretome of *P. echinulatum*, with a number of spectra in glucose higher than in other medium employed.

The specific activity of xylanase, dosed with xylan from beechwood substrate (Figure 8E-F), was higher in medium formulated with SCB or cellulose, especially for mutant strains, which stood out with respect to the wild type, as can be seen in Table 2. The presence of  $\beta$ -xylosidases found in both strains with more spectra in SCB and cellulose also showed specific activity in these medium. However, again,  $\beta$ -xylosidases activities were detected in medium elaborated with glucose or glycerol, since that spectra were not found in these medium. Higher specific activities of hemicellulases in media prepared with cellulose can be explained by the characterization of carbon sources used. The cellulose used in this work consists of 12.19% xylose, while SCB employed consists of 6.57% xylose (data not shown).

The specific activity of pectinases was lower when compared with activities of cellulases and hemicellulases, which corroborate the data obtained in proteomics (Figure 8G-

H), must be noted that the enzyme pectin lyase identified in proteomic analysis (Table 3) was produced in higher level by the mutant and the spectra were found only in the medium elaborated with glucose, while in the wild type, the enzyme was detected only in cellulose. The low arabinofuranosidase activities, determinated with  $\rho$ NPA (Figure 8A-B), in both strains are in accord with the low expression of this enzyme in the proteomic analysis. The absence of arabinose in media prepared with cellulose and the low amount of this sugar in the media prepared with SCB (~2%), corroborate these results.

Different esterases were found in both strains, most part with more spectra in cellulose, such as CE1, CE5 and CE10. The highest specific activity for both strains was also displayed in the medium elaborated with cellulose (Figure 8G-H). The specific activity in starch from potato was also higher when the mutant strain was used (Figure 8I-J). In both strains, the highest activity was detected in the medium prepared with glucose, followed by glycerol. However, there were limitations to establish some relationships between enzyme activities with the results obtained in secretomic broths. Possibly this is due to synergistic interactions between enzymes.



**Figure 8 Specific enzymatic activities of *Penicillium echinulatum* strains in submerged cultures using different carbon sources at 96h.** The graphs on the left (A) correspond to the wild type 2HH and on the right (B) correspond to the mutant strain S1M29. The hydrolytic potential of the broths of *Penicillium echinulatum* strains were tested on different substrates. The names of substrates employed are described in the section Abbreviations of this article.

**Table 1 Identified cellulose-degradation/modifying enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	CAZyme	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>			
						2HH			
						Glu	Gly	SCB	Cel
g2773	Cellobiohydrolase I	GH7 (CBM1)	<i>Penicillium decumbens</i>	56	Y	0	0	81	107
g8068	Cellobiohydrolase II	GH6 (CBM1)	<i>Penicillium decumbens</i>	49	Y	0	0	16	4
g8473	Endoglucanase 1	GH5 (CBM1)	<i>Penicillium echinulatum</i>	44	Y	0	0	19	27
g5809	Endoglucanase Cel5C	GH5 (CBM1, CBM46)	<i>Penicillium decumbens</i>	69	Y	0	1	28	30
g2788	Endoglucanase I	GH7 (CBM1)	<i>Penicillium decumbens</i>	50	Y	0	0	5	4
g2291	Endoglucanase II	GH5 (CBM1)	<i>Penicillium decumbens</i>	44	Y	0	0	4	4
g2659	Endo-β-1,4-glucanase	GH5 (CBM1)	<i>Penicillium oxalicum</i>	52	Y	27	0	0	3
g3996	Endo-β-1,4-glucanase	GH12	<i>Penicillium oxalicum</i>	26	Y	0	0	9	10
g7274	Endo-β-1,4-glucanase	GH5	<i>Penicillium oxalicum</i>	55	N	0	0	5	1
g6766	β-glucosidase I	GH3	<i>Penicillium decumbens</i>	93	Y	0	7	2	1
g8479	Related to β-glucosidase	GH132	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	46	Y	0	2	0	22
g3303	Cellulose monooxygenase Cel61A	AA9	<i>Penicillium oxalicum</i>	26	Y	0	0	3	0
g8342	Cellulose monooxygenase	AA9	<i>Penicillium oxalicum</i>	45	Y	0	0	3	0
g5167	Swollenin	CBM1, CBM63	<i>Penicillium oxalicum</i>	52	Y	0	0	1	4
g1074	GMC oxidoreductase	AA3	<i>Neosartorya fischeri</i>	70	Y	0	0	0	0
g3947	GMC oxidoreductase	AA3	<i>Penicillium roqueforti</i>	67	N	0	4	0	0

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

**Table 2 Identified hemicellulose-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	CAZyme	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>							
						2HH				S1M29			
						Glu	Gly	SCB	Cel	Glu	Gly	SCB	Cel
g2645	Xylanase	GH10 (CBM1)	<i>Penicillium decumbens</i>	44	Y	0	0	1	10	0	0	21	27
g1025	Endo-β-1,4-xylanase	GH10	<i>Penicillium oxalicum</i>	40	Y	0	0	12	21	0	0	0	1
g3831	Endo-β-1,4-xylanase	GH30	<i>Penicillium oxalicum</i>	53	Y	0	0	5	11	0	0	0	2
g5166	Endo-β-1,4-xylanase	GH11 (CBM1)	<i>Penicillium oxalicum</i>	31	Y	0	0	0	2	1	0	2	5
g3240	β-xylosidase	GH43	<i>Penicillium oxalicum</i>	64	Y	0	0	0	8	0	0	0	0
g1531	β-xylosidase	GH43	<i>Penicillium oxalicum</i>	38	Y	0	0	8	0	0	0	0	0
g2200	β-xylosidase	GH3	<i>Penicillium oxalicum</i>	85	Y	0	0	0	1	0	0	0	15
g5735	α-mannosidase	GH47	<i>Penicillium oxalicum</i>	56	Y	0	14	7	3	0	16	0	3
g395	Exo-α-1,6-mannosidase	GH125	<i>Sphaerulina musiva</i>	56	N	0	12	0	2	0	7	0	0
g5829	β-1,4-mannanase	GH5 (CBM1)	<i>Penicillium oxalicum</i>	47	Y	0	0	7	8	0	2	0	12
g8513	Sorbitol/xylulose reductase	GH99	<i>Aspergillus clavatus</i>	28	N	0	13	6	22	0	2	1	1
g315	Acetyl xylan esterase	CE1 (CBM1)	<i>Penicillium oxalicum</i>	41	Y	0	0	0	0	0	0	1	1
g2707	Acetyl xylan esterase	CE5	<i>Penicillium oxalicum</i>	24	Y	0	0	0	5	0	0	1	2

<sup>a</sup> Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup> The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

**Table 3 Identified pectin-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	CAZyme	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>							
						2HH				S1M29			
						Glu	Gly	SCB	Cel	Glu	Gly	SCB	Cel
g4880	Pectin lyase	PL1	<i>Penicillium oxalicum</i>	40	Y	0	0	0	1	12	0	0	0
g3609	Exo- $\alpha$ -L-1,5-arabinanase	GH93	<i>Penicillium oxalicum</i>	44	Y	0	0	0	2	0	0	0	0

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

**Table 4 Identified hemicellulose/pectin-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	CAZyme	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>			
						2HH			
						Glu	Gly	SCB	Cel
g1097	α-L-arabinofuranosidase	GH62 (CBM1)	<i>Penicillium oxalicum</i>	41	Y	0	0	0	0
g7308	α-L-arabinofuranosidase	GH43	<i>Penicillium oxalicum</i>	34	Y	0	2	2	0
g1098	α-L-arabinofuranosidase	GH43 (CBM1)	<i>Penicillium oxalicum</i>	62	Y	0	0	0	1

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

**Table 5 Identified lignin-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	CAZyme	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>			
						2HH			
						Glu	Gly	SCB	Cel
g1557	Isoamyl alcohol oxidase	AA7	<i>Talaromyces stipitatus</i>	66	Y	11	2	6	0
g1100	Isoamyl alcohol oxidase	AA7	<i>Arthroderma benhamiae</i>	58	Y	2	0	0	2
g5086	Isoamyl alcohol oxidase	AA7	<i>Aspergillus flavus</i>	67	Y	0	0	0	1
g6365	Related to Isoamyl alcohol oxidase	AA7	<i>Fusarium fujikuro</i>	69	Y	0	1	3	3
g7414	FAD dependent oxidoreductase	AA7	<i>Aspergillus clavatus</i>	54	Y	0	2	2	1
g5776	6-hydroxy-D-nicotine oxidase	AA7	<i>Aspergillus kawachii</i>	54	Y	3	4	2	2

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

**Table 6 Identified starch-degradation enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	CAZyme	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>			
						2HH			
						Glu	Gly	SCB	Cel
g4201	α-amylase	GH13	<i>Penicillium oxalicum</i>	74	Y	0	2	2	1
g5478	Glucoamylase Amy15A	GH15 (CBM20)	<i>Penicillium oxalicum</i>	66	Y	1	1	0	0
g36	Glucoamylase	GH15 (CBM20)	<i>Penicillium oxalicum</i>	68	Y	1	0	0	0
g7292	α-glucosidase	GH31	<i>Penicillium oxalicum</i>	108	Y	0	7	0	0
g1651	α-trehalase	GH65	<i>Penicillium oxalicum</i>	119	Y	0	0	0	0

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

**Table 7 Identified fungal cell wall degradation/modifying enzymes and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	CAZyme	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>			
						2HH			
						Glu	Gly	SCB	Cel
g7097	Chitin glucanosyltransferase	GH16	<i>Penicillium oxalicum</i>	39	Y	41	11	12	13
g1080	Chitinase1	GH18	<i>Penicillium oxalicum</i>	49	Y	1	25	0	1
g8496	Chitinase 1, class 5	CBM50	<i>Grosmannia clavigera</i>	37	Y	16	0	0	0
g1258	Exo-β-1,3-glucanase	GH17	<i>Penicillium oxalicum</i>	47	Y	72	5	4	4
g4052	β-1,3-glucanosyltransferase	GH17	<i>Penicillium oxalicum</i>	33	Y	9	8	3	15
g284	β-N-acetylhexosaminidase	GH3	<i>Penicillium oxalicum</i>	38	Y	29	19	7	3
g244	β-1,3-glucanosyltransglycosylase	GH72	<i>Penicillium oxalicum</i>	49	Y	0	9	7	6
g3495	Chitosanase	GH75	<i>Penicillium oxalicum</i>	37	Y	30	12	3	3
g5309	Exo-β-1,3-glucanase	GH5	<i>Penicillium oxalicum</i>	45	Y	0	3	5	8
g6946	Chitin glucanosyltransferase	GH16 (CBM 18)	<i>Penicillium oxalicum</i>	47	Y	5	6	5	2
g980	β-1,6-N-acetyl glucosaminidase	GH20	<i>Penicillium oxalicum</i>	67	Y	0	4	4	2
g2799	β-1,3-glucanosyl transglycosylase	GH72	<i>Penicillium oxalicum</i>	53	Y	0	0	2	1
g1191	β-1,3-glucanosyl transglycosylase	GH72 (CBM 43)	<i>Penicillium oxalicum</i>	57	Y	2	0	1	0
g3950	Exo-β-1,3-glucanase	GH5	<i>Penicillium oxalicum</i>	46	Y	0	1	0	0
g6368	Chitinase	GH18	<i>Penicillium oxalicum</i>	47	Y	0	3	0	3
g4641	β-1,3-glucanase	GH17	<i>Penicillium oxalicum</i>	68	N	3	3	0	0
g5953	β-1,6-glucanase	GH30	<i>Penicillium oxalicum</i>	52	Y	0	0	0	0
g8051	α-1,3-glucanase	GH71 (CBM24)	<i>Penicillium oxalicum</i>	114	Y	7	0	0	2
						0	0	0	5

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

**Table 8 Identified enzymes involved in plant cell wall modifications and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	CAZyme	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>			
						2HH			
						Glu	Gly	SCB	Cel
g1590	Carboxylesterase, type B	CE10	<i>Penicillium roqueforti</i>	62	Y	9	1	0	2
g7004	Carbohydrate acetyl esterase	CE16	<i>Penicillium oxalicum</i>	33	Y	0	0	0	5
g5807	Homoserine acetyltransferase	CE1	<i>Talaromyces marneffei</i>	37	N	0	0	1	1
g1708	Carboxylesterase, type B	CE10	<i>Penicillium roqueforti</i>	61	Y	0	0	0	1

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

### 3. Discussion

Microbial cellulase and hemicellulase production is dependent on the carbon source [24]. The substrates used in this study have provided a high heterogeneity of secreted proteins due to the substrate and the protein profile related to each strain. Proteins and enzymes related to degradation of biomass, in particular the CAZymes, were found in *P. echinulatum* and the enzyme control change according to the different carbon source. Also it is possible to confirm that both strains have potential for hydrolysis of cell wall, highlighting the specificities of the mutant strain.

The data indicate that the mutant is more suitable for production of enzymes to hydrolyze the plant cell wall in comparison with the wild type, especially when the mutant strain was grown in culture medium formulated with SCB. This information is relevant for the production of enzyme complexes of lower cost, since there is a greater amount of proteins secreted by the mutant to degrade lignocellulosic wastes that are less costly and more complex.

In the production of second generation ethanol, the cost of the enzyme is one of the major bottlenecks and the cost of the substrate for the enzyme production can contribute decisively this value, once that a ton of cellulose used for the cellulases production costs around US\$ 1000 per ton, while the steam explosion SCB, is commercialized for US\$ 40 a ton (unpublished data).

The results obtained in this work suggest that, in the genetic improvement process of this fungus performed by mutagenesis employing different mutagens [11,12] numerous changes, possibly at the level of regulation/gene expression, post-translational modifications and alterations in the capacity to secrete extracellular proteins occurred with the mutant. These doubts will be elucidated in the future with a conjunct analysis of the secretome, transcriptome and genome data.

Few data related to genetics of this fungus have been published until now. Rubini et al. [25] isolated, cloned and expressed one endoglucanase *egl 1* of the mutant *P. echinulatum* 9A02S1 and found high hydrolytic activity in medium formulated with CMC. Endoglucanasic activity is a feature of *P. echinulatum* which remained in S1M29 strain and it is according to the higher cellulolytic activities detected in this strain, as can be seen in Table 1 (protein g8473), showing that it is well expressed.

The use of different carbon sources for the production of cellulases and hemicellulases by *P. echinulatum* was already previously reported by Novello et al. [17] and Schneider et al. [18]. Novello et al. [17] studied the production of endoglucanases,  $\beta$ -glucosidases and xylanases by strains 2HH, 9A02S1 and S1M29 of *P. echinulatum*, employing cellulose, glucose and xylose as carbon sources and reported that xylose acts as an inducer for the production of xylanases and cellulases, in particular, endoglucanases. The authors also found higher enzyme titers in cultures performed with mutant strains 9A02S1 and S1M29 than with the wild type 2HH.

Schneider et al. [18] studied the effect of six different carbon sources (sucrose, glucose, glycerol, cellulose *Celuflok*<sup>®</sup>, untreated elephant grass, and sugar cane bagasse pretreated by steam explosion) in the production of enzymes by the mutant strain S1M29 of *P. echinulatum*, in the same conditions. Among the six carbon sources, cellulose and SCB were the most suitable for the production of filter paper activity, endoglucanases, xylanases and β-glucosidases. However, sucrose and glucose showed β-glucosidase activities similar to those obtained with the insoluble sources. The presence of these enzymes, especially β-glucosidase, in the work of Schneider et al. [18], with more activity in 96 h (at the end of the cultivation process), justify the choice of 96 h for proteome analysis in the present study.

Some enzymes detected, as β-1,3-glucanase (GH17, table 7) have not secretion signal and may be related to a possible indication of cell wall autolysis at 96 h of cultivation, as reported by Vaheri et al. [26] and Fontaine et al. [27]. Many others fungal cell wall degrading enzymes, as chitinases (GH18, table 7), exo-β-1,3-glucanase (GH17, table 7) and others already cited (chitosanase, β-N-acetylhexosaminidase, lysophospholipase) may be also related to cell lysis, however, they have a secretion signal. All these enzymes can be induced simply by the same sugars than the other CAZymes and may be an indication that 2HH responds worst to stress than S1M29, and thus produces a smaller amount of enzymes which actually contribute to the degradation of biomass. From the analysis of the mycelial growth on glucose (data not shown), it has been found in wild type a higher concentration of biomass with relation to mutant until 96 hours of cultivation. Therefore, the greater growth of wild type on carbon sources of facilitated uptake, such as glucose, may be providing the production of these enzymes related to degradation of fungal cell walls, whereas the mutant makes use of more complex carbon sources for the production of enzymes related to degrading biomass.

The only secretome work of *P. echinulatum* done so far, was conducted by Ribeiro et al. [4], employing the intermediate mutant 9A02S1. In this study, the secretome profile of *P. echinulatum* after grown on integral sugar cane bagasse, microcrystalline cellulose and three types of pretreated sugar cane bagasse was evaluated using shotgun proteomics. The study revealed that the enzymatic repertoire of *P. echinulatum* is geared mainly toward producing enzymes from the cellulose complex (endoglucanases, cellobiohydrolases and β-glucosidases). Glycoside hydrolase family members, important to biomass-to-biofuels conversion strategies, were identified, including endoglucanases GH5, 6, 7, 12, 17 and 61, β-glycosidase GH3, xylanases GH10 and GH11, as well as debranching hemicellulases from GH43, GH62 and CE2 and pectinases from GH28.

These results agree with the information obtained in the present study, conducted with 2HH and S1M29 strains, which was verified in media formulated with cellulose or SCB (in our study,

pretreated by steam explosion) a larger amount of spectra in most enzymes relating to degradation of biomass, such as cellobiohydrolases I and II (GH 6 and 7), endoglucanases 1 and Cel5C (GH5) and xylanases (GH10), demonstrating the potential of producing these enzymes especially by mutant strain S1M29. However, more proteins were identified in our study and the mutant S1M29 secretes greater diversity of glycosyl hydrolases when compared to the mutant 9A02S1, e.g. GH15, 16, 30, 31, 72, 75, 99, 125 and 132, as well as other CAZy enzymes (Table 9). In addition, the database employed in our work refers to the sequencing of *P. echinulatum* strains, another aspect that makes this proteomic analysis more consistent.

**Table 9 Comparison between secretomic profile of different *Penicillium echinulatum* strains.**

<i>Penicillium echinulatum</i> strains			
Comparative parameters	Mutant 9A02S1 (Ribeiro <i>et al.</i> , 2012)	Wild type 2HH (This work)	Mutant S1M29 (This work)
<b>Proteomic approach</b>	Shotgun LC-MS/MS	Shotgun 1D-PAGE/LC-MS/MS	Shotgun 1D-PAGE/LC-MS/MS
<b>Carbon sources</b>	Sugar cane bagasse and cellulose	Sugar cane bagasse, cellulose, glucose and glycerol	Sugar cane bagasse, cellulose, glucose and glycerol
<b>Proteins identified</b>	99	147	129
<b>Glicosil hidrolases</b>	16	24	25
<b>Major proteins found*</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellobiohydrolases</li> <li>- Endoglucanases</li> <li>- β-glucosidases</li> <li>- Xylanases</li> <li>- Debranching hemicellulose/pectin</li> <li>- Pectinases</li> <li>- Swollenin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellobiohydrolases</li> <li>- Endoglucanases</li> <li>- β-glucosidases</li> <li>- Xylanases</li> <li>- Debranching hemicellulose/pectin</li> <li>- Pectinases</li> <li>- Swollenin</li> <li>- Cellulose monooxygenases</li> <li>- Ligninases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellobiohydrolases</li> <li>- Endoglucanases</li> <li>- β-glucosidases</li> <li>- Xylanases</li> <li>- Debranching hemicellulose/pectin</li> <li>- Pectinases</li> <li>- Swollenin</li> <li>- Cellulose monooxygenases</li> <li>- Ligninases</li> </ul>

\* In this work, the major proteins were found with a larger spectra number in sugar cane bagasse and cellulose, with exception of pectinases and ligninases.

Many species of filamentous fungi have their secretome described in the last ten years, between them, *Penicillium* species. Interesting, *P. decumbens* [28] secretome showed a more diversified system of lignocellulolytic enzymatic than *Trichoderma reesei*, particularly for cellulose binding domain-containing proteins and hemicellulases. Moreover, the proteomic analysis of *P.*

*decumbens* revealed that the production of lignocellulolytic enzymes is greater in media containing cellulose and wheat bran than in glucose, which agrees with part of our studies.

Some proteomic studies involving the more efficient producer of cellulases known, i.e., *T. reesei*, have also been performed [29-32] and some results of these studies can be comparable to *P. echinulatum*. For example, in these studies involving the wild type QM6a and the mutant RUT-C30 of *T. reesei* grown in media containing cellulose, corn straw and sawdust, the authors concluded that lignocellulolytic enzyme in the secretome of both strains of *T. reesei* are dependent of lignocellulosic carbon sources [29]. Moreover, the functional classification of these biological quantified proteins revealed that 31,3 and 17,9% corresponds to cellulases and hemicellulases, respectively, similar data with the amount of these enzymes, especially hemicellulases, in *P. echinulatum* secretome (Figure 5).

Other similar study was conducted with *Trichoderma harzianum* grown on glucose, carboxymethyl cellulose, xylan and sugar cane bagasse [30]. The characterization of *T. harzianum* secretome revealed that sugar cane bagasse induced greater cellulolytic and xylanolytic activity when compared to the other substrates. The secretome analysis identified a wide range of proteins, including CAZymes. Despite the secretome induced by sugar cane bagasse have the greatest cellulolytic and xylanolytic activities, it does not correspond to a higher complexity of proteins, since the induced secretome by carboxymethyl cellulose was significantly more diverse.

For *P. echinulatum*, sugar cane bagasse also induced a greater diversity of proteins being cultivated with the mutant strain, while cellulose was best for the wild type. As can be seen in Table 1, the highest amount of cellulases enzymes spectra were even checked in the sugar cane bagasse medium, suggesting that the genes related to degradation of lignocellulosic biomass are potentially transcribed during the cultivation of the fungus, but the relative proportions of the expressed proteins may vary widely depending on the growth medium and the cultivation conditions [31]. For instance, the extracellular cellulolytic system of *T. reesei* in response to 1 mmol/L sophorose is composed of 70% cellobiohydrolases, 30% endoglucanases and only 1% of  $\beta$ -glucosidase [32] while in our study, when *P. echinulatum* grows in sugar cane bagasse, which proved to be ideal for production of cellulases by the mutant strain, its cellulolytic complex consists of 55% cellobiohydrolases, 38% endoglucanases and 1%  $\beta$ -glucosidases, being that the mutant secretes approximately 2-3 times more cellulases compared to the wild type, as has also been suggested to *T. reesei* [31].

These data lead to note that *P. echinulatum* presents a cellulolytic complex similar to *T. reesei*. However, as reported by Martins et al. [33], *P. echinulatum* show higher relations between

$\beta$ -glucosidases and filter paper activity than *T. reesei*. This can be seen when glucose or glycerol are used as carbon sources for  $\beta$ -glucosidases production (Figure 8).

The genus *Aspergillus* is also reported in the literature as a good producer of enzymes related to degradation of biomass and the secretome of different species have been studied [34-36]. One study conducted with *A. fumigatus* evaluated GHs production by the fungus grown in medium containing rice straw as a carbon source [34]. This study identified the presence of three  $\beta$ -glucosidases, while in *P. echinulatum* in this work, two  $\beta$ -glucosidases were found; and five isoforms of cellobiohydrolases I/ endoglucanases in the secretome, demonstrating the potential production of these enzymes, in particular  $\beta$ -glucosidase, feature recognized in *Aspergillus* species.

A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover was also studied [35], finding in the secretome several proteins identified in *P. echinulatum*; moreover, mainly hemicellulases, followed by cellulases, polygalacturonases, chitinases, esterases and lipases. Other important enzymes to reduce the recalcitrance of the biomass to hydrolysis, as cellobiose dehydrogenase and feruloyl esterase, were found in great abundance.

*Aspergillus niger* is also reported as an excellent producer pectinases [36]. Although pectinases have been identified in *P. echinulatum* secretome, their diversity and amount is considerably smaller in comparison with other lignocellulolytic enzymes found.

Many studies involving the fungus *Neurospora crassa*, as reported another producer of proteins involved in cell wall degradation, have been described [37-40], despite its secretome shows more differences compared to *P. echinulatum*. A study by Sun et al. [38] reveals that *N. crassa* is able to express a wide variety of enzymes that degrade hemicellulose, and both xylan and cellulose induce the expression of hemicellulose genes. A recent study by Benz et al. [39], sought to understand how *N. crassa* responds in action to three main cell wall polysaccharides: cellulose, hemicellulose and pectin. This analysis provided evidence that *N. crassa* uses a "toolbox" for the degradation of pectin.

In *A. niger* and *T. reesei*, the xylose exposure induces hemicellulase genes and enzymes involved in the utilization of xylose (xylose reductase and D-xylulokinase), although levels above 1 mmol/L have the opposite effect [40, 41]. Secretomic information found in the wild type 2HH of *P. echinulatum*, for example, the presence of D-xylose reductase and sorbitol/xylulose reductase found with larger spectra in 2HH suggest that in the mutagenic process, these enzymes due to still unknown factors, decreased its presence in the mutant strain. In the context of enzymatic hydrolysis of plant cell wall and ethanol production from the sugars released this, it is concluded their importance for the context of biorefineries.

The presence of non-hydrolytic protein like swollenins, proteins similar to plant cell wall expansins, which can realize the disruption of the crystalline parts of the cellulose chains, was observed only in the medium formulated with SCB or cellulose, for both strains (Table 1), however, more expressed in the mutant strain. Swollenins contain a carbohydrate binding domain (CBM) and have been proposed to disrupt cellulose structure via nonhydrolytic mechanisms [42], although the biochemical action of these proteins remains to be fully elucidated [43]. As substrate accessibility is one key issue in plant cell wall degradation, accessory proteins are likely to enhance the efficiency of this process [44]. However, in some cases, the presence of a CBM in an enzyme may also prevent that it act at different points on a substrate.

The presence of some enzymes involved in the degradation/depolymerization of lignin, such as isoamyl alcohol oxidase [45], manganese superoxide dismutase [46] and glutathione S-transferase [47] showed the first evidence of these enzymes production by the fungus *P. echinulatum*. This is more a characteristic of the genetic evolution of the fungus, since the secretome analysis of mutant 9A02S1 [4], strain before S1M29 mutant, failed to identify lignin proteins, such as extracellular oxidase.

The lignin peroxidase, manganese-peroxidase and laccase were generally considered as lignin degrading enzymes. However, according to Blanchette et al. [48] they are too big to penetrate plant cell wall. Hence, to get accesses microbes initially activate easily diffusing several oxidases, reactive radical generating enzymes, and quinine reducing enzymes [49, 50]. The spectral count of isoamyl alcohol oxidase, flavin adenine dinucleotide (FAD) oxidoreductase and superoxide dismutase indicated that *P. echinulatum* degrade lignin through oxidases. In addition, this study also quantified expressions of glutathione-S-transferase, another enzyme important on the mechanism of lignin degradation.

#### 4. Conclusions

In this study, among the 165 proteins identified in the secretome of both strains, approximately 40% were proteins with CAZy function. The glycoside hydrolases were the most abundant. The secretome of *P. echinulatum* presents a potential for degradation, mainly of cellulose and hemicellulose. Pectinases were found in minor amounts; however, for the first time, proteins related to lignin degradation were found. Although cellulose and SCB were the carbon sources inducing for cellulolytic and hemicellulolytic enzymes production, glucose and glycerol inducing others proteins, as fungal cell wall degrading enzymes, enzymes related to lignin degrading and the presence of  $\beta$ -glucosidase found more in glycerol than in any other carbon source. Differences in the proteins expression through enzymatic activity and by analyzing the number of spectra

generated by proteomics data show the distinction existing in the secretome of wild type 2HH and mutant S1M29, in which the mutant toolbox is more focused on the cellulases production than the wild type. These findings allow us to conclude the potential of strains of *P. echinulatum*, in particular, the mutant, for lignocellulosic biomass degradation.

## 5. Materials and methods

### 5.1 Growth and maintenance of *Penicillium* strains

The wild type 2HH and mutant S1M29 strains of *P. echinulatum* were grown and maintained in 100 mL of cellulose agar (agar-C) consisting of 40 mL of swollen cellulose, 10 mL of mineral solution, 0,1 g of proteose peptone (Oxoid L85<sup>®</sup>), 2 g of agar, and 50 mL of distilled water. The strains were grown in inclined tubes on C-agar for 7 days at 28 °C until the formation of conidia and then stored at 4 °C as in Dillon et al. [11].

### 5.2 Production of enzymes

The culture medium for enzyme production consisted of 0,2% (w/v) peptone; 0,05% (w/v) Prodex<sup>®</sup>; 1% (w/v) carbon source; 0,1% (v/v) Tween 80<sup>®</sup>; 5% (v/v) mineral solution and distilled water to complete a final volume of 100 mL.

Erlenmeyer flasks (500 mL), containing 100 mL of the production medium, were inoculated with a suspension of  $1 \times 10^5$  conidia per mL and kept at 28 °C, in a reciprocal agitation of 180 rpm for 120 h. The experiment was performed in triplicate and supernatants of 48, 96, and 120 h of cultivation were separated for enzymatic analysis and protein quantification. The samples were kept under refrigeration and sodium azide for a final concentration of 0,02% (w/v).

To evaluate the effect of different carbon sources on the production of enzymes by the wild type and mutant *P. echinulatum*, employing: cellulose Celuflok E<sup>®</sup> (Celuflok Comercial Ltda, Cotia, SP, Brazil), sugar cane bagasse pretreated by steam explosion (Usina Vale do Rosário, Morro Agudo, SP, Brazil), glucose (Quimidrol - Joinville, SC, Brazil), and glycerol (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA).

### 5.3 Enzyme dosages

The specific enzymatic activity of the collected supernatants was tested using a set of 13 different substrates (Megazyme - Wicklow, Ireland and Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA) in order to measure the activity of cellulases, hemicellulases, pectinases, esterases and amylases.

To determine the cellulases, the following substrates were employed: Avicel®, carboxymethyl cellulose (CMC), lichenan (from *Cetraria islandica*),  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-celllobioside ( $\rho$ NPC), and  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ( $\rho$ NPG). The following substrates were employed to determine the hemicellulases: rye arabinoxylan, xylan from beechwood,  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside ( $\rho$ NPX) and mannan. Pectinases were measured using pectin substrate (from citrus fruits) and  $\rho$ -nitrophenyl- $\alpha$ -D- arabinofuranosidase ( $\rho$ NPA). Esterases were determined with feruloyl acetate and amylases were dosed with potato starch substrate.

All enzymatic activities were performed in triplicate. The methodology employed to determine enzymatic activities was performed according to Cota et al. [51] with modifications, where 50  $\mu$ L of substrate solution (0,5% w/v of the substrate diluted in water) were added to 46  $\mu$ L of enzyme solution and 4  $\mu$ L of sodium citrate buffer 1 mol/L, pH 4.8. The mixture was incubated at 50 °C for different periods depending on the substrate. The reaction time of cultivation was 30 min for potato starch, Avicel®, CMC, mannan, pectin,  $\rho$ NPA,  $\rho$ NPX,  $\rho$ NPC, and  $\rho$ NPG (for the latter two, 20 mL of enzyme solution, 30  $\mu$ L of sodium citrate buffer 1 mol/L dilute to the samples containing cellulose or SCB). The reaction time of 10 min was used for lichenan, for samples containing SCB or cellulose (10  $\mu$ L enzyme solution, 4  $\mu$ L sodium citrate buffer, and 36  $\mu$ L distilled water); 10 min for xylan and rye arabinoxylan for samples of the mutant strain grown in SCB or cellulose (10  $\mu$ L enzyme solution, 4  $\mu$ L sodium citrate buffer and 36  $\mu$ L distilled water). The reactions with filter paper and the remaining polysaccharides were stopped by adding 300  $\mu$ L and 100  $\mu$ L of dinitrosalicylic acid reagent solution (DNS), respectively [52]. The reactions carried out with  $\rho$ NP substrates were stopped by adding 100  $\mu$ L of sodium carbonate 10 (w/v) [53].

The activity of esterases was determined according to the methodology described by Koseki et al. [54]. For the samples containing cellulose or SCB were used 5  $\mu$ L of enzyme solution, 20  $\mu$ L of sodium acetate buffer (SAB) 100 mmol/L, pH 5.5, and 15  $\mu$ L distilled water was added. For samples containing glucose or glycerol as carbon sources, 20  $\mu$ L of enzyme solution and 20  $\mu$ L of SAB buffer were used. Then, 10  $\mu$ L of substrate (50 mmol/L in Dimethylsulfoxide solution – DMSO) was added, incubated at 40 °C in a thermocycler for 30 min. Next, the reaction was stopped by adding 100  $\mu$ L solution of Fast Garnet reagent (0.1% w/v and SDS 15% w/v in DMSO) and kept at room temperature for 10 min.

The units of enzymes with activity on the polysaccharides were assumed as the amount of enzyme capable of releasing 1  $\mu$ mol of reducing sugar per min. Units of enzyme with activity on the  $\rho$ -nitrophenyl substrates were assumed as the amount of enzyme capable of liberating 1  $\mu$ mol of  $\rho$ -nitrophenyl per min. Esterases were assumed as the amount of enzyme capable of liberating 1  $\mu$ mol of  $\alpha$ -naphthyl acetate per minute.

#### **5.4 Determination of total soluble proteins**

For the quantitative determination of soluble proteins in the secretome of *P. echinulatum* wild type and mutant strain, we employed the method of Bradford [55] with Bio-Rad Protein Assay. A calibration curve was constructed using 80 µL bovine serum albumin (BSA) standard solutions with concentrations between 0 and 25 µg.mL<sup>-1</sup> and 20 µL of Bradford reagent. The protein quantification of *P. echinulatum* secretome samples was made with 20 µL of Bradford reagent and 80 µL of sample. The reaction was incubated for 10 minutes at room temperature and then read in a spectrophotometer at 595 nm.

#### **5.5 SDS-PAGE of total proteins**

Samples of 96 h from *P. echinulatum* were subjected to analysis of protein profile. Samples containing cellulose or SCB were carried out in triplicate, whereas the samples containing glucose or glycerol were taken in a replicate.

To determine the molecular weight of proteins, electrophoresis was performed in polyacrylamide gels containing 0,1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The separating gel was prepared in 12% (w/v) while the stacker gel was prepared 4% (w/v) according to the methodology described by Laemmli [56]. After standard the samples, 11 µg of sample were applied to each slot to electrophoresis running in vertical cube Bio Rad Mini Protean System Cell at 110 V for approximately one and a half hour.

The revelation of bands from the gel was performed incubating the gel for 30 minutes in a solution of 0,2% (w/v) Coomassie Brilhant Blue G 250, 50% (v/v) of ethanol and 10% (v/v) of acetic acid. After, the gel was washed with distilled water and immersed in a solution of 50% (w/v) ethanol and 10% (w/v) acetic acid for 30 minutes. The entire development process was performed under stirring of 50 rpm until bands were visualized.

#### **5.6 Digestion of proteins for analysis by mass spectrometry**

The digestion of proteins for analysis by mass spectrometry was performed in two steps, performing them in two successive days, according to Gonçalves et al. [57]. First we cut of 8 gel bands per lane. SDS was removed with 500 µL of a destain solution during 2 h and the bands were dehydrated for 5 min with 200 µL acetonitrile, reduced during 30 min with 30 µL dithiothreitol (DTT) solution and alkylated with 30 µL of iodoacetoamide (IAA) solution, also for 30 min. Then the bands were washed with ammonium bicarbonate 100 mmol/L (for 10 min). A new dehydration

with acetonitrile and rehydration with sodium bicarbonate was performed. Protein digestion was carried out with 30 µL of trypsin solution (1mg/mL) in ammonium bicarbonate at 37 °C overnight.

On the second day, was added 10 – 30 µL of extraction solution 1 (5% (v/v) of formic acid) in each microtube (depending on the size of the gel), incubated for 10 minutes at room temperature, given a quick spin in a centrifuge and the supernatant was collected and transferred to another microtube. Then, were added 12 µL of the second extraction solution (5% (v/v) formic acid in 50% (v/v) acetonitrile) in each microtube, and after 10 minutes, the supernatant was collected and transferred to a tube which was previously separated and already contains the extract from the previous step. This step was repeated one more time. Finally, the samples were evaporated in the speed vac so was left approximately 1 µL of sample. The samples were stored at -20 °C until being transferred to the mass spectrometer.

## **5.7 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry**

For the application of trypsinized fractions in the LC-MS/MS each sample was resuspended with 12 µL of 0,1% (v/v) formic acid and aliquot of 4,5 µL of the peptides mixture was injected into the chromatograph RP-nanoUPLC (nanoAcuity, Waters). Chromatography was performed on C18 (100 nm × 100 mm) equilibrated with 0,1% (v/v) formic acid column buffer. The elution gradient was 2% (v/v) to 90% (v/v) acetonitrile in 0,1% (v/v) formic acid. The whole system operated at the speed of 0,6 µL/min. As the peptides were eluted from the column, they were injected into the spectrometer quadrupole-time of flight Q-Tof (Ultima Mass Spectrometer Waters) with a source of ionization electron spray, for 60 minutes. The instrument was operated in the "top three - MS and MS/MS mode", where each MS spectrum acquired, its three peptides not monoloaded (precursors) most abundant were selected for further fragmentation (generating y and b sets) and sequenced generating a MS/MS spectrum for each peptide.

The spectra were acquired using MassLynx v.4.1 software (Waters - Milford, MA, USA) and the raw data were converted to the format "peak list format (mgf)" by Mascot Distiller software v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.). These results were processed by Mascot v.2.3.01 engine (Matrix Science Ltd.) software against the genome sequencing database of *P. echinulatum* strains (2HH: 8504 sequences, 4286814 residues; M29: 8552 sequences, 4298942 residues) for digestion and spectra generation of MS/MS theoretical. The following parameters were used in this process: carbamidometilação as a fixed modification, oxidation of methionine as a variable modification, one error of trypsin cleavage and maximum allowable error in the peptide mass of 0,1 Da. Only peptides with at least five amino acids and score within probability to be not a random event p<0.05 were selected as a peptide cleavage product (i.e. they are part of a protein). The peptide was

considered only when it differs by at least one amino acid for another or when differs in covalent modifications (including elongations of N- or C-terminal).

Bioinformatics tools were used to build a secretome table. To validate the proteomic data was employed the Scaffold 4 Proteomic software (version 4.3.2 20140225), where the database of proteins from the two strains of *P. echinulatum* (2HH and S1M29) were crossed. Conditions configured to accept the identification of a protein were: protein probability thresholds greater than 99%, with a minimum of two different peptides for protein identification, each one with 95% certainty. The search results remained false discovery rate (FDR) of peptides and proteins equal to zero.

In order to verify if the sequences of proteins annotated from the genomes of 2HH and S1M29 strains with different identification were the same, the alignment of the proteins was performed using the Clustal Omega software (Multiple Sequence Alignment - EMBL-EBI) [58].

Verified the proteins sequences, the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [59] software was employed. The parameters used to make the choice of protein were: e-value  $\leq e^{-40}$ ; identity  $\geq 40\%$  and query cover  $\geq 80\%$ .

With the aim of finding proteins active on carbohydrate (CAZymes), as well as the presence or absence of carbohydrate-binding modules, the software dbCAN (DataBase for Carbohydrate-active enzyme ANotation) was used [60].

The presence or absence of signal peptide was carried out using the SignalP software (version 4.1 - Server-CBS) [61], SecretomeP (version 2.0) [62] and YLoc (Interpretable Subcellular Localization Prediction) [63].

## References

1. Rubin EM: **Genomics of cellulosic biofuels.** *Nature* 2008, **454**:841– 845.
2. Popper ZA, Michel G, Herve C, Domozych DS, Willats WG: **Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2011, **62**:567–90.
3. Pérez J, Muñoz-Dorado J, De-la-Rubia T, Martínez J: **Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview.** *Int Microbiol* 2002, **5**:53–63.
4. Ribeiro DA, Cota J, Alvarez, TM, Bruchli F, Bragato J, Pereira BMP, Pauletti BA, Jackson G, Pimenta MTB, Murakami MT, Camassola M, Ruller R, Dillon AJP, Pradella JG, Paes Leme AF, Squina FM: **The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e50571.

5. Tian C, Beeson WT, Iavarone, AT, Sun J, Marletta MA, Cate JHD, Glass NL: **Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa***. *Proc Nat. Acad Sci* 2009, **106**(52):22157-22162.
6. Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS: **Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology**. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**:506 –577.
7. Martinez D, Berka RM, Henrissat, B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EG, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov, AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao, J, Barabote R, Nelson MA, Dettter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS: **Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*)**. *Nat Biotechnol* 2008, **26**:553-560.
8. Schuster A, Schmoll M: **Biology and biotechnology of *Trichoderma***. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **87**(3): 787–799.
9. Martens-Uzunova ES, Schaap PJ: **Assessment of the pectin degrading enzyme net work of *Aspergillus niger* by functional genomics**. *Fungal Genet Biol* 2009, **46**:S170–79.
10. Gusakov AV, Sinitsyn AP: **Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass**. *Biofuels* 2012, **3**:463–477.
11. Dillon AJP, Zorgi C, Camassola M, Henriques JAP: **Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β-glucosidase activities**. *App Microbiol Biotechnol* 2006, **70**:470-476.
12. Dillon AJ, Bettio M, Pozzan FG, Andrichetti T, Camassola M: **A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose**. *J Appl Microbiol* 2011, **111**(1): 48-53.
13. Camassola M, Dillon AJP: **Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation**. *Appl Biochem Biotechnol* 2010, **162**(7):1889-900.
14. Zampieri D, Guerra L, Camassola M, Dillon AJP: **Secretion of endoglucanases and β-glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources**. *Industrial Crops and Products* 2013, **50**: 882-886.
15. Menegol D, Scholl AL, Fontana RC, Dillon AJP, Camassola M: **Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass**. *Fuel* 2014, **133**:232–240.

16. Reis L, Schneider WDH, Fontana R, Camassola M, Dillon AJP: **Cellulase and Xylanase Expression in Response to Different pH Levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 Medium.** *BioEnergy Research* 2014, **7**:60-67.
17. Novello M, Vilasboa J, Schneider WDH, Reis L, Fontana RC, Camassola M: **Enzymes for second generation ethanol: exploring new strategies for the use of xylose.** *RSC Advances* 2014, **4**(41): 21361-21368.
18. Schneider WDH, Reis L, Camassola M, Dillon AJP: **Morphogenesis and Production of Enzymes by *Penicillium echinulatum* in Response to Different Carbon Sources.** *Biomed Res Int* 2014, 1-10.
19. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B: **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**: 233–38. CAZy Database. <http://www.cazy.org/>
20. Rudnick PA, Wang X, Yan X, Sedransk N, Stein SE: **Improved normalization of systematic biases affecting ion current measurements in label-free proteomics data.** *Mol Cell Proteomics* 2014, **13**(5): 1341-1351.
21. Jeffries TW: **Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi.** *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 1983, **27**: 1-32.
22. Henriksson G, Johansson G, Pettersson G: **A critical review of cellobiose dehydrogenases.** *J Biotechnol* 2000, **78**(2): 93–113.
23. Zámocký M, Hallberg M, Ludwig R, Divne C, Haltrich D: **Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific of GMC oxidoreductases in fungi.** *Gene* 2004, **338**(1): 1-14.
24. Juhasz T, Szengyel Z, Reczey K, Siika-Aho M, Viikari L: **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** *Process Biochem* 2005, **40**:3519–3525.
25. Rubini MR, Dillon AJP, Kyaw CM, Faria FP, Poças-Fonseca MJ, Silva-Pereira I: **Cloning, characterization and heterologous expression of the first *Penicillium echinulatum* cellulose gene.** *J Appl Microbiol* 2009, **108**:1187-1198.
26. Vaheri MP, Vaheri MEO, Kauppinen VS: **Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol.** *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 1979, **8**:73-80.

27. Fontaine T, Hartlan RP, Diaquin M, Siemel C, Latgé JP: **Differential patterns of activity displayed by two exo-beta-1,3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall.** *J Bacteriol* 1997, **179**(10):3154-3163.
28. Liu G, Zhang L, Wei X, Zou G, Qin Y, Ma L, Li J, Zheng H, Wang S, Wang C, Xun L, Zhao GP, Zhou Z, Qu Y: **Genomic and Secretomic analyses reveal unique features of the lignocellulolytic enzyme system of *Penicillium decumbens*.** *PLoS ONE* 2013, **8**(2): e55185.
29. Adav SS, Chao LT, Sze SK: **Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation.** *Mol Cell Proteomics* 2012, **11**: M111.012419.
30. Gómez-Mendoza DP, Junqueira M, Ferreira do Vale LH, Domont GB, Filho EXF, Sousa MV, Ricart CAO: **Secretomic Survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates.** *J Proteome Res* 2014, **13**(4):1810–1822.
31. Allen AL, Roche CD: **Effects of strain and fermentation conditions on production of cellulase by *Trichoderma reesei*.** *Biotechnol Bioeng* 1989, **33**:650-656.
32. Gritzali MJ, Brown RD: **The cellulase system of *Trichoderma*. The relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose grown cells.** *Adv Chem Ser* 1979, **181**:237-260.
33. Martins LF, Kolling D, Camassola M, Dillon AJP, Ramos LP: **Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates.** *Biores Technol* 2007, **99**:1417-1424.
34. Sharma M, Roni R, Asiya N, Harinder SO, Bhupinder SC: **Evaluation of glycosyl hidrolases in the secretome of *Aspergillus fumigatus* and saccharification of alkali-treated rice straw.** *Appl Biochem Biotechnol* 2011, **163**:557-591.
35. Saykhedkar S, Ray A, Ayoubi-Canaan P, Hartson SD, Prade R, Mort AJ: **A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover.** *Biotechnol Biofuels* 2012, **5**:52.
36. Tsang A, Butler G, Powlowski J, Panisko EA, Baker SE: **Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome.** *Fungal Genet Biol* 2009, **46**:S153–60.
37. Glass NL, Schmoll M, Cate JHD, Coradetti S: **Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi.** *Annu Rev Microbiol* 2013, **67**:477-498.

38. Sun J, Tian C, Diamond S, Glass NL: **Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*.** *Eukaryotic cell* 2012, **11**(4):482-93.
39. Benz JP, Chau BH, Zheng D, Bauer S, Glass NL, Somerville CR: **A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in *Neurospora crassa* reveals carbon source-specific cellular adaptations.** *Mol Microbiol* 2014, **91**(2):275-299.
40. de Vries RP, Visser J, de Graaff LH: **CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation.** *Res Microbiol* 2009, **150**:281–85.
41. Mach-Aigner AR, Pucher ME, Mach RL: **D-xylose as a repressor or inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*).** *Appl Environ Microb* 2010, **76**:1770–76.
42. Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B: **Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials.** *Eur J Biochem* 2002, **269**:4202–11.
43. Jager G, Girfoglio M, Dollo F, Rinaldi R, Bongard H: **How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis.** *Biotechnol Biofuels* 2011, **4**:33.
44. Eijsink VG, Vaaje-Kolstad G, Varum KM, Horn SJ: **Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research.** *Trends Biotechnol* 2008, **26**:228–35.
45. Ferreira P, Hernandez-Ortega A, Herguedas B, Martínez ÁT, Medina M: **Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation.** *J Bio Chem* 2009, **284**:24840-24847.
46. Barr DP, Aust SD: **Effect of superoxide and superoxide dismutase on lignin peroxidase-catalyzed veratryl alcohol oxidation.** *Arch Biochem Biophys* 1994, **311**: 378-382.
47. Adav SS, Ravindran A, Sze SK: **Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass.** *J Proteomics* 2012, **75**(5):1493-504.
48. Blanchette AR, Crueler WE, Height DE, Akhtar M, Akin DE: **Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*.** *J Biotechnol* 1997, **53**:203–13.
49. Henriksson G, Zhang LM, Li JB, Ljungquist P, Reitberger T, Pettersson G: **Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme?** *Biochim Biophys Acta Prot Struct Mol Enzym* 2000, **1480**:83–91.

50. Ander P, Marzullo L: **Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation.** *J Biotechnol* 1997, **53**:115–31.
51. Cota J, Alvarez TM, Citadini AP, Santos CR, Neto MO, Oliveira RR, Pastore GM, Ruller R, Prade RA, Murakami MT, Squina FM: **Mode of operation and low-resolution structure of a multi-domain and hyperthermophilic endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Thermotoga petrophila*.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **406**: 590-594.
52. Miller GL: **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Anal Chemis* 1959, **31**: 426-428.
53. Daroit DJ, Simonetti A, Hertz PF, Brandelli A: **Purification and characterization of extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Monascus purpureus*.** *J Microbiol Biotechnol* 2008, **18**: 933-941.
54. Koseki T, Takahashi K, Handa T, Yamane Y, Fushinobu S, Hashizume K: **N-linked oligosaccharides of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase are important for thermostability and catalysis.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, **70**:2476-2480.
55. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**: 248-254.
56. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T<sub>4</sub>.** *Nature* 1970, **227**: 680-685.
57. Gonçalves TA, Damásio ARL, Segato F, Alvarez TM, Bragatto J, Brenelli LB, Citadini APS, Murakami MT, Ruller R, Paes Leme AF, Prade RA, Squina FM: **Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides.** *Bioresource Technol* 2012, **119**: 293-299.
58. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
59. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
60. <http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/>
61. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
62. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>
63. <http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>

## Abbreviations

1D – PAGE: One dimensional polyacrylamide electrophoresis; LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; CAZy/CAZymes: Carbohydrate active enzymes; SCB: Sugar cane bagasse pretreated by steam explosion; CEL: Cellulose; GLY: Glycerol; GLU: Glucose; GHs: Glicoside hydrolases; CEs: Carbohydrate esterases; PLs: Polysaccharide Lyases; AAs: Auxiliary activities; CBMs: carbohydrate-binding module; pNP:  $\rho$ -nitrophenyl; pNPC:  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside; pNPG:  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; pNPX:  $\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside; pNPA:  $\rho$ -nitrophenyl- $\alpha$ -D-arabinofuranoside; AVI: Avicel<sup>®</sup>; LIC: Lichenan; CMC: Carboxymethyl cellulose; ARAX: Rye arabinoxylan; XIL: Xylan; MAN: Mannan; PEC: Pectin; FEA: Feruloyl acetate; PST: Potato starch; DNS: Dinitrosalicylic acid; SAB: Sodium acetate buffer; DMSO: Dimethyl sulfoxide; BSA: Bovine serum albumin; DTT: Dithiothreitol; IAA: Iodoacetamide; SDS: Sodium dodecyl sulfate; UPLC: Ultra performance liquid chromatography; Q-Tof: Quadrople time of flight; FDR: False discovery decoy; BLAST: Basic local alignment search tool; dbCAN: Database for carbohydrate-active enzyme annotation; YLoc: Interpretable subcellular localization prediction.

## Competing interest

The authors declare that they have no competing interest.

## Acknowledgments

The authors thank the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Laboratory of Science and Technology of Bioethanol (CTBE) and University of Caxias do Sul (UCS). This research was supported by grants from the São Paulo Research Foundation - FAPESP (2008/58037-9) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) of Brazil (310177/2011-1).

**Additional file 1: Other proteins identified and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>							
					2HH				S1M29			
					Glu	Gly	SCB	Cel	Glu	Gly	SCB	Cel
<i>Adhesion proteins</i>												
g5908	Filamentous hemagglutinin/adhesin	<i>Beauveria bassiana</i>	26	Y	23	21	18	40	0	15	8	5
g1204	GPI anchored cell wall protein	<i>Neosartorya fischeri</i>	23	Y	39	8	4	6	11	10	2	6
g4263	GPI anchored cell wall protein	<i>Aspergillus oryzae</i>	34	Y	0	18	7	13	0	3	0	0
g8160	GPI-anchored cell wall protein	<i>Aspergillus ruber</i>	42	Y	8	1	2	1	4	8	0	3
g120	Mannose-binding lectin	<i>Penicillium roqueforti</i>	50	Y	0	0	0	0	0	15	0	3
g5107	IgE-binding protein	<i>Aspergillus oryzae</i>	24	N	18	5	2	9	5	0	17	0
g5607	IgE binding protein	<i>Penicillium digitatum</i>	23	Y	0	0	0	0	42	0	0	0
<i>Oxidoreductases</i>												
g1768	D-xylose reductase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	36	N	0	0	80	23	0	0	15	8
g992	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	<i>Aspergillus terreus</i>	36	N	0	7	2	10	0	0	0	0
g2710	Nitroreductase family protein	<i>Penicillium digitatum</i>	29	N	0	0	9	0	0	0	1	0
g5742	Manganese superoxide dismutase	<i>Penicillium chrysogenum</i>	20	N	0	10	0	8	0	3	0	1
g6048	Formate dehydrogenase	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	45	N	0	6	0	3	0	0	0	0
g5493	Cu,Zn superoxide dismutase SOD1	<i>Neosartorya fischeri</i>	18	Y	0	0	41	0	0	0	0	0

**Additional file 1 (continued)**

g7218	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	<i>Penicillium roqueforti</i>	44	Y	0	1	0	3	0	0	0	0
g2794	Aldehyde dehydrogenase	<i>Penicillium roqueforti</i>	54	N	0	2	0	0	0	0	0	0

**Proteases and peptidases**

g5859	Aminopeptidase 2	<i>Aspergillus terreus</i>	99	N	0	21	19	12	0	22	2	0
g6527	Aspartic endopeptidase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	43	Y	0	6	11	7	0	16	2	4
g3775	Tripeptidyl peptidase A	<i>Neosartorya fischeri</i>	64	Y	28	0	3	0	87	0	0	4
g592	Prolidase	<i>Penicillium digitatum</i>	52	N	0	2	9	2	0	15	0	1
g2787	Yapsin	<i>Talaromyces marneffei</i>	53	Y	3	0	0	0	0	0	0	8
g5496	Vacuolar serine protease	<i>Penicillium oxalicum</i>	53	Y	0	1	0	2	0	6	0	4
g2636	Carboxypeptidase CpyA/Prc1	<i>Neosartorya fischeri</i>	64	Y	0	1	2	1	0	3	0	1
g7745	Aspartyl aminopeptidase	<i>Penicillium digitatum</i>	56	N	0	7	4	6	0	6	0	0
g8551	Tripeptidyl-peptidase sed1	<i>Penicillium digitatum</i>	70	N	10	0	0	0	0	0	0	0
g2785	Aspergillopepsin	<i>Neosartorya fischeri</i>	28	Y	16	0	0	0	0	0	0	6
g4035	$\gamma$ -glutamyltranspeptidase	<i>Penicillium roqueforti</i>	63	Y	0	2	0	1	0	2	0	0
g7131	Probable dipeptidyl peptidase 3	<i>Penicillium roqueforti</i>	79	N	0	1	2	1	0	1	0	0
g6667	Aminopeptidase	<i>Penicillium digitatum</i>	99	N	0	2	0	0	0	1	0	0
g708	Aspartic protease pepAc	<i>Aspergillus niger</i>	47	Y	3	2	0	0	0	0	0	0
g5823	carboxypeptidase S1	<i>Talaromyces marneffei</i>	52	Y	1	1	0	0	0	0	0	0
g989	Probable leucine aminopeptidase 2	<i>Penicillium roqueforti</i>	53	Y	0	1	0	0	0	1	0	0
g3656	Serine peptidase	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	58	Y	1	0	0	0	0	1	0	0

**Additional file 1 (continued)**

g2790	Penicillopepsin	<i>Penicillium janthinellum</i>	41	Y	0	0	0	0	0	0	0	1
g5790	Peptidase S10, serine carboxypeptidase	<i>Penicillium roqueforti</i>	63	Y	0	2	0	0	0	0	0	0
g4250	$\alpha/\beta$ -hydrolase	<i>Penicillium roqueforti</i>	38	Y	0	0	0	0	0	0	0	1
g1378	Peptidase S9, prolyl oligopeptidase	<i>Penicillium roqueforti</i>	81	Y	0	43	10	10	0	40	1	5
g4879	Amidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	64	Y	6	9	0	0	0	8	0	0
<b>Lipases</b>												
g1946	Lipase	<i>Penicillium roqueforti</i>	30	Y	0	1	0	2	0	39	4	19
g347	Lysophospholipase phospholipase B	<i>Penicillium chrysogenum</i>	69	Y	34	24	2	2	33	7	1	5
g1420	Lipase, class 2	<i>Penicillium roqueforti</i>	29	Y	0	0	0	9	0	0	0	0
<b>Glutaminases</b>												
g6338	Glutaminase A	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	75	Y	0	3	5	3	2	11	0	5
g6870	Glutaminase	<i>Penicillium digitatum</i>	93	Y	0	2	0	19	0	4	0	0
g5109	Glutaminase	<i>Aspergillus niger</i>	75	Y	0	0	0	0	0	0	0	2
<b>Chaperones</b>												
g6709	Heat shock protein	<i>Penicillium digitatum</i>	70	N	0	2	0	1	2	1	0	0
g7547	Mitochondrial Hsp70 chaperone (Ssc70)	<i>Penicillium digitatum</i>	72	N	0	1	0	0	0	4	0	0
g4939	Tubulin-specific chaperone Rbl2	<i>Neosartorya fischeri</i>	13	N	0	0	0	0	4	0	0	0
g351	ATP-dependent molecular chaperone HSC82	<i>Arthroderra otae</i>	80	N	0	0	0	0	2	0	0	0
<b>Hypothetical proteins</b>												
g3760	Hypothetical protein PDE_06089	<i>Penicillium oxalicum</i>	18	Y	27	26	0	3	5	5	0	11

**Additional file 1 (continued)**

g5020	Hypothetical protein PDE_06797	<i>Penicillium oxalicum</i>	25	Y	0	46	0	0	0	0	0	0
g7861	Hypothetical protein PDE_02536	<i>Penicillium oxalicum</i>	19	Y	3	2	0	2	0	7	0	1
g2722	Hypothetical protein PDE_02180	<i>Penicillium oxalicum</i>	123	Y	28	0	0	0	0	0	0	0
g8113	Hypothetical protein PDE_01252	<i>Penicillium oxalicum</i>	16	Y	0	26	43	0	0	5	0	0
g2258	Hypothetical protein PDE_04474	<i>Penicillium oxalicum</i>	33	Y	0	1	1	4	0	1	0	1
g2829	Hypothetical protein PDE_00925	<i>Penicillium oxalicum</i>	22	Y	8	0	0	0	2	0	1	0
g2294	Hypothetical protein PDE_00503	<i>Penicillium oxalicum</i>	17	Y	0	21	0	0	0	4	0	0
g3357	Hypothetical protein PDE_05699	<i>Penicillium oxalicum</i>	109	Y	39	0	0	0	18	0	0	0
g1259	Hypothetical protein PDE_03110	<i>Penicillium oxalicum</i>	19	Y	0	0	0	14	3	0	0	30
g5510	Hypothetical protein PDE_02988	<i>Penicillium oxalicum</i>	34	Y	6	3	1	0	0	0	1	1
g6328	Hypothetical protein PDE_01808	<i>Penicillium oxalicum</i>	11	N	19	0	11	2	2	0	0	0

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

**Additional file 2: Other proteins identified (Miscellaneous) and spectrum count in different carbon sources by wild type 2HH and mutant S1M29 of *Penicillium echinulatum* at 96 h during submerged cultivation.**

Accession Number	Identified proteins	Organism	MW (kDa)	Secretion <sup>b</sup>	Spectrum count <sup>a</sup>							
					2HH				S1M29			
					Glu	Gly	SCB	Cel	Glu	Gly	SCB	Cel
g4278	Ubiquitin-40S ribosomal protein	<i>Aspergillus oryzae</i>	18	N	7	0	13	13	93	0	0	30
g5678	Extracellular serine protein	<i>Aspergillus fumigatus</i>	87	Y	0	18	4	2	0	0	5	3
g4533	Nucleoside diphosphate kinase	<i>Penicillium roqueforti</i>	17	N	0	4	21	5	0	2	21	7
g5115	6-phosphogluconolactonase	<i>Aspergillus kawachii</i>	45	Y	0	13	0	4	0	11	0	0
g1883	Glucose-6-phosphate isomerase	<i>Penicillium roqueforti</i>	62	N	0	2	3	5	0	1	0	0
g5494	Transaldolase	<i>Aspergillus flavus</i>	35	N	0	2	2	3	1	0	0	2
g3663	Aldose /Glucose-6-phosphate 1-epimerase	<i>Penicillium roqueforti</i>	50	N	0	2	3	1	0	3	0	1
g7606	Aminotransferase, class V	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	66	N	0	1	2	3	0	2	0	0
g2745	2,3-dihydroxybenzoate decarboxylase	<i>Penicillium roqueforti</i>	39	N	0	0	2	5	0	0	0	0
g2426	Elongation factor 1 $\gamma$ -domain	<i>Aspergillus oryzae</i>	46	N	0	14	2	17	0	14	0	0
g2400	Actin	<i>Penicillium oxalicum</i>	37	N	0	2	7	69	3	0	0	0
g8382	Cytidine deaminase	<i>Penicillium roqueforti</i>	15	Y	0	0	11	0	0	1	0	7
g7675	Fumarylacetoacetate	<i>Penicillium roqueforti</i>	47	N	0	1	3	1	0	0	0	0
g1374	Phytase	<i>Aspergillus nidulans</i>	57	Y	4	3	0	0	0	2	0	0
g50	Ribonuclease T2	<i>Penicillium roqueforti</i>	28	Y	0	1	0	0	0	3	0	2

**Additional file 2 (continued)**

g3158	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine S-methyltransferase	<i>Aspergillus clavatus</i>	86	N	0	0	5	0	0	0	0	0
g153	HIT domain protein	<i>Aspergillus kawachii</i>	15	Y	0	0	6	4	0	0	0	0
g3795	Glutathione S-transferase	<i>Penicillium digitatum</i>	26	N	0	0	3	3	0	0	1	0
g7872	Enolase/allergen Asp F 22	<i>Aspergillus clavatus</i>	47	N	0	5	0	0	0	2	0	0
g409	Cyanate hydratase	<i>Aspergillus nidulans</i>	18	N	0	0	10	5	0	0	11	0
g760	Cytochrome b5	<i>Aspergillus oryzae</i>	14	N	0	0	4	2	0	2	0	3
g7391	Nuclease PA3 <sup>b</sup>	<i>Cordyceps militaris</i>	36	Y	0	3	0	2	0	3	0	0
g2296	Phosphoesterase	<i>Penicillium roqueforti</i>	120	N	0	0	1	0	0	3	0	0
g8122	Necrosis- and ethylene-inducing protein 2 precursor	<i>Botrytis tulipae</i>	26	Y	0	0	0	0	0	1	0	2
g597	Cyclophilin-like peptidyl prolyl cis-trans isomerase	<i>Aspergillus niger</i>	21	Y	0	4	0	17	0	0	0	0
g2491	HAD superfamily hydrolase	<i>Aspergillus oryzae</i>	28	N	0	1	0	5	0	0	0	0
g7753	Inorganic pyrophosphatase	<i>Penicillium roqueforti</i>	33	N	0	1	0	5	0	0	0	0
g6008	Purine nucleoside permeasse	<i>Penicillium roqueforti</i>	43	N	1	0	0	0	3	0	0	0
g4614	Pyridoxine biosynthesis protein pyroA	<i>Penicillium digitatum</i>	32	N	0	1	0	0	0	3	0	0
g608	Allergen Asp F4	<i>Neosartorya fischeri</i>	36	Y	0	0	0	1	1	0	0	0
g371	Actin-binding, cofilin/tropomyosin type	<i>Penicillium roqueforti</i>	50	N	0	0	0	0	0	0	0	1
g1092	Conidial hydrophobin Hyp1/RodA	<i>Aspergillus kawachii</i>	15	Y	0	0	0	5	0	0	0	0
g4522	Conidial pigment biosynthesis oxidase Arb2/brown	<i>Aspergillus oryzae</i>	67	Y	0	2	0	0	0	0	0	0
g7764	Glutamine amidotransferase-like protein, class I	<i>Sphaerulina musiva</i>	26	Y	0	6	0	0	0	0	0	0

**Additional file 2 (continued)**

g7393	Putative DNA repair exonuclease SIA1	<i>Aspergillus oryzae</i>	46	N	0	0	0	0	0	1	0	0
g3371	Actin-binding, cofilin/tropomyosin type	<i>Penicillium roqueforti</i>	25	Y	0	0	0	5	0	0	0	0
g8197	60S ribosomal protein L22	<i>Talaromyces stipitatus</i>	14	N	0	0	0	0	2	0	0	0
g8526	Dynein light chain	<i>Aspergillus niger</i>	15	Y	0	0	0	0	2	0	0	0
g1652	Catalase B	<i>Penicillium roqueforti</i>	80	Y	0	0	0	0	0	1	0	0

<sup>a</sup>Secretomic analysis based on spectral counting. An analysis was conducted for samples grown on cellulose or SCB (mean of triplicates) and for samples grown on glucose or glycerol (one replicate).

<sup>b</sup>The secretion of each protein was verified by the software SignalP, SecretomeP and YLoc.

## 5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- linhagem selvagem 2HH e mutante S1M29 de *P. echinulatum* metabolizam fontes de carbono como celulose, bagaço de cana-de-açúcar, glicose e glicerol e secretam uma diversidade de enzimas lignocelulolíticas em cultivo submerso;
- nas condições testadas, enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e esterases foram produzidas em quantidades maiores pela linhagem mutante S1M29;
- maiores atividades enzimáticas são verificadas em 96 e 120 horas de cultivo em meios elaborados com BCA ou em celulose, para a maior parte dos substratos utilizados;
- o uso de glicerol proporcionou a maior produção de avicelases e pectinases pela linhagem selvagem 2HH, enquanto que glicose proporcionou maiores produções de laminarinases por ambas as linhagens;
- celobiohidrolases,  $\beta$ -glicosidases, arabinanases e amilases são secretadas em maiores quantidades quando a linhagem mutante S1M29 é crescida em glicose;
- o secretoma de *P. echinulatum* é constituído principalmente por enzimas CAZy, sendo encontradas glicosil hidrolases, carboidrato esterases, pectina liases, enzimas auxiliares, bem como módulos de ligação a carboidratos;
- *P. echinulatum* secreta uma grande variedade de glicosil hidrolases, sendo as GH3, GH5, GH17, GH43 e GH72 as mais abundantes;
- celobiohidrolases e endoglicanases são as enzimas majoritárias secretadas por *P. echinulatum*, visto que a linhagem mutante S1M29 secreta quantidades maiores destas enzimas, quando comparada com a linhagem selvagem 2HH;
- $\beta$ -glicosidases, xilanases, endoxilanases,  $\beta$ -xilosidases e mannanases também foram identificadas e em menores quantidades, pectinases, ligninases e amilases;
- fontes de carbono complexas como celulose e bagaço de cana-de-açúcar foram utilizadas por *P. echinulatum*, especialmente pela linhagem mutante, para a produção de enzimas relacionadas à degradação de biomassa, principalmente celulases;
- fontes de carbono mais simples como glicose e glicerol foram utilizadas pelas linhagens para a produção de enzimas relacionadas à degradação de lignina e amido, bem como enzimas relacionadas com a degradação da parede celular fúngica e proteínas de adesão;
- apesar da linhagem selvagem 2HH secretar uma diversidade maior de proteínas exclusivas, a linhagem mutante S1M29 secreta uma maior quantidade de proteínas sendo estas, em sua maioria, enzimas degradadoras de material lignocelulósico.

## 6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas relacionadas a este trabalho, sugerem-se:

- realizar estudos de secretômica em diferentes tempos de cultivo (24, 48, 72 e 120 horas) e empregando outras fontes de carbono, como xilana e pectina;
- determinar a ação de outras enzimas presentes no secretoma das linhagens de *Penicillium echinulatum*, empregando substratos para mensurar ligninases e enzimas envolvidas na degradação de parede celular fúngica, como quitinases;
- aprofundar os estudos empregando glicerol nos meios de cultivo, uma fonte de carbono solúvel e, ao mesmo, um resíduo da indústria de biocombustíveis, contribuindo para a produção de enzimas de hidrólise de parede celular vegetal a fim reduzir as interferências na reologia dos meios de produção, tanto em cultivos conduzidos em frascos como em biorreatores;
- realizar estudos de transcriptômica de *P. echinulatum* cultivado em diferentes fontes de carbono.

## 7 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Abrahão-Neto, J.; Rossini, C. H.; El-Gogari, S.; Henrique-Silva, F.; Crivelaro, O.; El-Dorry, H. (1995). Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Biochem.** 34: 10456-10462.
- Adav, S. S.; Ravindran, A.; Chao, L. T.; Tan, L.; Singh, S.; Sze, S. K. (2011). Proteomics analysis of pH and strains dependent protein secretion of *Trichoderma reesei*. **J. Proteome Res.** 10:4579–4596.
- Adav, S.S.; Chao, L.T.; Sze, S. K. (2012a). Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. **Mol. Cell. Proteomics.** 11(7).
- Adav, S. S.; Ravindran, A.; Sze, S. K. (2012b). Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. **J. Proteomics.** 75(5):1493-504.
- Ademark, P.; de Vries, R. P.; Hagglund, P.; Stalbrand, H.; Visser, J. (2001). Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding alpha-galactosidase and a beta-mannosidase involved in galactomannan degradation. **Eur. J. Biochem.** 268(10): 2982-2990.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* Rut-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochem. Eng. J.** 40: 399-407.
- Ahrens, C. H.; Brunner, E.; Qeli, E.; Basler, K.; Aebersold, R. (2010). Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 11(11):789-801.
- Aidoo, K. E.; Hendry, R.; Wood, B. J. B. (1981). Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 12:6-9.

- Bailey, M. J.; Tahtiharju, J. (2003). Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 62: 156-162.
- Baker, J. O. et al. (2000). Investigation of cell wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 84-86: 217 – 223.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical. **Energy Conv. Manag.** 52: 858-875.
- Barbosa, E. B.; Vidotto, A.; Polachini, G. M.; Henrique, T.; Marqui, A. B. T.; Tajara, E. H. (2012). Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 58(3): 366-375.
- Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 326-338.
- Beeson, W. T.; Phillips, C. M.; Cate, J. H. D.; Marletta, M. A. (2012). Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. **J. Am. Chem. Soc.** 134(2): 890–892.
- Benz, J. P.; Chau, B. H.; Zheng, D.; Bauer, S.; Glass, N. L.; Somerville, C. R. (2014). A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in *Neurospora crassa* reveals carbon source-specific cellular adaptations. **Mol. Microbiol.** 91(2):275-299.
- Berrin, J. G.; Navarro, D.; Couturier, M.; Olive, C.; Grisel, S.; Haon, M.; et al. (2012). Exploring the natural fungal biodiversity of tropical and temperate forests toward improvement of biomass conversion. **Appl. Environ. Microbiol.** 78: 6483–6490.
- Bettin, F. (2010). Cinética de crescimento e produção de lacases do fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 (Fr.) Singer em processo submerso em biorreatore com agitação mecânica. **Tese de doutorado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.

Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.** 18: 355-383.

Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. **Trends. Biotechnol.** 3: 286-290.

Biely, P.; Vrsanska, M.; Tenkanen, M.; Kluepfel, D. (1997). Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **J. Biotechnol.** 57: 151-166.

Bio & Farma. Celulase: calcanhar-de-aquiles. (2009). **Disponível (online)** [http://www.quimica.com.br/revista/qd467/biofarma/bio\\_farma02.html](http://www.quimica.com.br/revista/qd467/biofarma/bio_farma02.html) (06 de abril).

BiofuelsDigest, (2014). GranBio starts cellulosic ethanol production at 21 million gallon plant in Alagoas, Brazil. **Disponível (online)**

<http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/09/24/granbio-starts-cellulosic-ethanol-production-at-21-mgy-plant-in-brazil/> (1º de outubro).

Bittencourt, L. R.; Silveira, M. M.; Dillon, A. J. P. (2002). In: VII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Brazil: **Resumos**, p. 209.

Bolam, D. N.; Ciruela, A.; McQueen-Mason, S.; Simpson, P.; Williamson, M. P.; Rixon, J. E.; Boraston, A.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J. (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. **J. Biochem.** 331: 775-781.

Boraston, A. B.; Bolam, D. N.; Gilbert, H. J.; Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochem. J.** 382: 769-781.

Bouws, H.; Beier, H.; Gross, H. (2008). Fungal secretomes – Nature's toolbox for white biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 80: 381-388.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.

Burnum, K. E.; Callister, S. J.; Nicora, C.; Purvine, S. O.; Hugenholtz, P.; Warnecke, F.; Scheffrahn, R. H.; Smith, R. D.; Lipton, M. S. (2010). Proteome insights into the symbiotic relationship between a captive colony of *Nasutitermes corniger* and its hindgut microbiome. **The ISME journal.** 5(1): 161-4.

Business Wire, (2014). O Futuro das Biorrefinarias Industriais, Fórum Econômico Mundial, 2010.

**Disponível (online)**

[http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_FutureIndustrialBiorefineries\\_Report\\_2010.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_FutureIndustrialBiorefineries_Report_2010.pdf) (16 de dezembro).

Cairo, J. P. L. F. (2012). Análise do digestoma do cupim inferior *Coptotermes gestroi* visando aplicação na produção de bioproductos lignocelulósicos. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil.

Call, H. P.; Mücke; I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lygnozym-process): Minireview. **J. Biotechnol.** 53: 163-202.

Camassola, M.; Bittencourt, L. R.; Shenem, N. T.; Andreaus, J.; Dillon, A. J. P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransform.** 22: 391-396.

Camassola, M. (2007). Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Penicillium echinulatum* em cultivos submersos e em estado sólido para a hidrólise de lignocelulósicos. **Tese de doutorado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.

Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2010). Cellulases and Xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 1889-1900.

Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2012). Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. **Open Access Scientific Reports.** 1(1).

Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Res.** 37: 233–38.

Canteri, M. H. G.; Moreno, L.; Wosiacki, G.; Scheer, A. P. (2012). Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros.** 22 (2): 149-157.

Carrau, J. L.; Dillon, A. J. P.; Ribeiro, R. T. S.; Leygue-Alba, N. M. R.; Azevedo, J. L. (1981). Produção de enzimas celulolíticas por microrganismos. In: Simpósio Internacional de Engenharia Genética. **Anais.** p.39. Piracicaba, SP, 1981.

Carvalo, C. C. (2005). Produção de ligninases por basiodiomicetos através de fermentação em estado sólido, caracterização e aplicação das enzimas. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, Brasil.

CAZy: Carbohydrate-Active enZYmes Database. (2014). Disponível (online): <http://www.cazy.org/> (3 de março).

Chen, S.; Xing, X. H.; Huang, J. J.; Xu, M. S. (2011). Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. **Enzyme Microb. Technol.** 48:100–5.

Cheng, Y.; Song, X.; Qin, Y; Qu, Y. (2009). Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10. **J. Appl. Microbiol.** 107: 1837–1846.

Chundawat, S. P., Lipton, M. S.; Purvine, S. O.; Uppugundla, N.; Gao, D.; Balan, V.; et al. (2011). Proteomics-based compositional analysis of complex cellulose-hemicellulase mixtures. **J. Proteome Res.** 10: 4365–4372.

Collins, T.; Hoyoux, A.; Dutron, A.; Georis, J.; Genot, B.; Dauvrin, T.; Arnaut, F.; Gerday, C.; Feller G. (2006). Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **J. Cereal Sci.** 43: 79-84.

Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews – Moll Cell Biol.** 6: 850-861.

Cota, J.; Alvarez, T. M.; Citadini, A. P.; Santos, C. R.; Neto, M. O.; Oliveira, R. R.; Pastore, G. M.; Ruller, R.; Prade, R. A.; Murakami, M. T.; Squina, F. M. (2011). Mode of operation and low-resolution structure of a multi-domain and hyperthermophilic endo-b-1,3-glucanase from *Thermotoga petrophila*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 406: 590-594.

Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. (1993).  $\beta$ -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17: 259-289.

Couturier, M.; Navarro, D.; Olive, C.; Chevret, D.; Haon, M.; Favel, A. *et al.* (2012). Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. **BMC Genomics.** 13:57.

Damaso, M. C. T.; Andrade, C. M. M. C.; Pereira Jr, N. (2002). Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Braz. J. Microbiol.** 33: 333-338.

Dekker, R. F. H.; Richards, G. N. (1976). Hemicellulases: Their occurrence purification properties and mode of action. **Adv. Carb. Chem. Biochem.** 32: 277-352.

Deswal, D.; Khasa, Y. P.; Kuhad, R. C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp.RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresour. Technol.** 102: 6065–6072.

de Vries, R. P.; Jansen, J.; Aguilar, G.; Parenicov'a, L.; Joosten, V.; *et al.* (2002). Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. **FEBS Lett.** 530: 41–47.

Dillon, A. J. P.; Malvessi, E.; Turelly, N.; Silveira, M. M. (1999). Produção de celulases por *Penicillium echinulatum*. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **Resumos.** p.III-3-III5. Rio de Janeiro, 1999.

- Dillon, A. J. P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J. A. P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and  $\beta$ -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 740-746.
- Dillon, A. J. P.; Bettio, M.; Pozzan, F. G.; Andrigotti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111: 48-53.
- Domingues, F. C.; Queirzoz, J. A.; Cabral, J. M. S; Fonseca, L. P. (2000). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 394-401.
- Esterbauer, H.; Steiner, W.; Labudova, I.; Hermann, A.; Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. **Bioresour. Technol.** 36: 51-65.
- Fan, L. T.; Lee, Y-H.; Beardmore, D. H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 177-199.
- Fengel, D.; Wegener, G. (1989). **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions.** Walter de Gruyter. Germany. 613p.
- Fisher, M. C.; Henk, D. A.; Briggs, C. J.; Brownstein, J. S.; Madoff, L. C.; McCraw, S. L.; et al. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature.** 484:186–94.
- Gao, L.; Gao, F.; Wang, L.; Geng, C.; Chi, L.; Zhao, J.; et al. (2012). N-glycoform diversity of cellobiohydrolase I from *Penicillium decumbens* and the synergism of a nonhydrolytic glycoform in cellulose degradation. **J. Biol. Chem.** 287: 15906–15915.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** 59: 257-268.
- Gilbert, H. J.; Stalbrand, H.; Brumer, H. (2004). How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. **Fungal Genet. Biol.** 41: 428-442.

Gill, J.; Rixon, J. E.; Bolam, D. N.; McQueen-Mason, S.; Simpson, P. J.; Williamson, M. P.; Hazlewood, G. P.; Gilbert, H. J. (1999). The type II and X cellulose-binding domains of *Pseudomonas* xylanase. A potentiate catalytic activity against complex substrates by common mechanism. **Biochem. J.** 342: 473-480.

Glass, N. L.; Schmoll, M.; Cate, J. H. D.; Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annu. Rev. Microbiol.** 67: 477-498.

GloboMeter, (2014). Meio ambiente – Energia. Disponível (online) <http://pt.globometer.com/index.php> (22 julho)

Gong, C. S.; Tsao, G. T. (1979). Cellulase and Biosynthesis regulation. **Ann. Reps. Ferment. Processes.** 3: 111-139

González-Vogel, A.; Eyzaguirre, J.; Oleas, G.; Callegari, E.; Navarrete, M. (2011). Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 89: 145–55.

Gómez-Mendoza, D. P. (2009). Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono. **Dissertação de mestrado**. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.

Gómez-Mendoza, D.P.; Junqueira, M.; Ferreira do Vale, L. H.; Domont, G. B.; Filho, E. X. F.; Sousa, M. V.; Ricart, C. A. O. (2014). Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. **J. Proteome Res.** 13(4): 1810–1822.

Gouvêa, P. F. (2013). Estudos genéticos e moleculares da produção de celulases e hemicelulases em *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger*. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, Brasil.

Guais, O.; Borderies, G.; Pichereaux, C.; Maestracci, M.; Neugnot, V. (2008). Proteomics analysis of “RovabioTM Excel”, a secreted protein cocktail from the filamentous fungus *Penicillium funiculosum* grown under industrial process fermentation. **J. Industrial Microbiol. Biotechnol.** 35(12): 1659–1668.

- Gusakov, A. V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends Biotechnol.** 29:419–25.
- Gutiérrez-Correa, M.; Ludeña, Y.; Ramage, G.; Villena, G. K. (2012). Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 167:1235–53.
- Han, W.; He, M. (2010). The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw composition. **Bioresour. Technol.** 101: 3724–3731.
- Harikrishna, S.; Rao, K. C. S.; Babu, J. S.; Reddy, D. S. (2000). Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Bioprocess Eng.** 22: 467-470.
- Henrissat, B. A.; ClaeysSENS, M.; Tomme, P.; Lemesle, L.; Mornon, J.P. (1989). Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. **Gene.** 81(1): 83-95.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. Journal.** 280: 309-316.
- Herpoel-Gimbert, I.; Margeot, A.; Dolla, A.; Jan, G.; Molle, D.; Lignon, S.; *et al.* (2008). Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnol. Biofuels.** 1:18.
- Hinz, S. W. A.; Pouvreau, L.; Joosten, R.; Bartels, J.; Jonathan, M. C.; Wery, J.; *et al.* (2009). Hemicellulase production in *Chrysosporium lucknowense* C1. **J. Cereal Sci.** 50:318–23.
- Horn, S. J.; Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Eijsink, V. G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol. Biofuels.** 5: 45.
- Ilmen, M.; Saloheimo, A.; Onnela, M. L.; Penttila, M. E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl Environ Microbiol.** 63: 1298–1306.

INCT, (2014). Centro de Prospecção de fungos e engenharia de enzimas. **Disponível (online)** <http://www.inctdobioetanol.com.br/pesquisa/4/Centro-de%20Prospec%C3%A7%C3%A3o-de-fungos-e-engenharia-de-enzimas> (25 de março).

INCT, (2014). Brasil vai produzir etanol de segunda geração em 2014. **Disponível (online)** <http://www.inctdobioetanol.com.br/notart/7/Brasil%20vai%20produzir%20etanol%20de%20segunda%20gera%C3%A7%C3%A3o%20em%202014> (25 de março).

Jami, M. S.; Garcia-Estrada, C.; Barreiro, C.; Cuadrado, A. A.; Salehi-Najafabadi, Z.; *et al.* (2010). The *Penicillium chrysogenum* extracellular proteome. Conversion from a food-rotting strain to a versatile cell factory for white biotechnology. **Mol. Cell. Proteomics.** 9: 2729–2744.

JGI, (2014). 1000 Fungal Genomes Project. **Disponível (online):** <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf> (04 de abril).

Jiang, D.; Zhu, W.; Wang, Y.; Sun, C.; Zhang, K-Q.; Yang, J. (2013). Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. **Biotechnol. Adv.** 31: 1562-1574.

Jones, L., McQueen-Mason, S. (2003). Expansin and cell growth. **Cur. Opin. Plant Biol.** 6: 603-610.

Jun, H.; Kieselbach, T.; Jönsson, L. J. (2011). Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. **Microbial Cell Fact.** 10: 68.

Kanna, M.; Yano, S.; Inoue, H.; Fujii, T.; Sawayama, S. Enhancement of beta-xylosidase productivity in cellulase producing fungus *Acremonium cellulolyticus*. (2011). **AMB Express** 1:15.

Karnaouri, A.; Topakas, E.; Antonopoulou, I.; Christakopoulos, P. (2014). Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila* **Front. Microbiol.** 5: 281.

Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.** 77: 215-227.

Klepacova, K.; Mravec, D.; Hajekova, E.; Bajus, M. (2003). Etherification of glycerol for diesel fuels. **Pet. Coal.** 45: 54-57.

Kim, Y.; Nandakumar, M.P.; Marten, Mark R.(2007). Proteomics of filamentous fungi. **Trends in Biotechnol.** 25: 395-400.

Kodof, L. V.; Kauppinen, S.; Christgau, S.; Andersen, L. N.; Heldt-Hansen, H. P.; Dorreich, K.; Dalboge, H. (1994). Cloning and characterization of two structurally and functionally divergent rhamnogalacturonases from *Aspergillus aculeatus*. **J. Biol. Chem.** 269(46): 29182-29189.

Kondo, T. (1997). The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **J. Polym. Sci. Part B: Polym. Physics.** 35(4): 717-723.

Koseki, T.; Takahashi, K.; Handa, T.; Yamane, Y.; Fushinobu, S.; Hashizume, K. (2006). N-linked oligosaccharides of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase are important for thermostability and catalysis. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 70: 2476-80.

Kubicek, C. P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R. L.; Kubicek-Pranz, E. M. (1993). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microb Technol.** 15: 90-99.

Kubicek C.P.; Mikus M.; Schuster A.; Schmoll M.; Seiboth B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnol. Biofuels** 2:19.

Kubicek, C.P.; Herrera-Estrella, A.; Seidl-Seiboth, V.; Martinez, D.A.; *et al.* (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biol.** 12(4): 40.

- Kubicek, C. P. (2013). Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. **J. Biotechnol.** 163:133–42.
- Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 23: 411-456.
- Kurasawa, T.; Yachi, M.; Suto, M.; Kamagata, Y.; Takao, S.; Tomita, F. (1992). Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. **Appl. Environ. Microb.** 58: 106-110.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural preoteins during the assembly of the head bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**. 227: 680-685.
- Larsson, S.; Cassland, P.; Jonsson, L. J. (2001). Development of a *Sacharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. **Appl. Environ. Microb.** 67: 1163-1170.
- Lawford, H. G.; Rousseau, J. D. (2003). Cellulosic fuel ethanol – alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 106: 457-469.
- Lee, Y.; Choi, D.; Kende, H. (2001). Expansins: ever-expanding number and functions. **Cur. Opin. Plant Biol.** 4: 527 – 532.
- Li, X.; Beeson, W. T.; Phillips, C. M.; Marletta, M. A.; Cate, J. H. (2012). Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. **Structure**. 20: 1051-1061.
- Liu, W.; Lu, Y.; Ma, G. (1999). Induction and glucose repression of endo-β-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochem.** 34: 67-72.
- Liu, G.; Qin, Y.; Li, Z.; Qu, Y. (2013). Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. **Biotechnol Adv.** 31: 962-975.

- Madlala, A. M.; Bissoon, S; Singh, S.; Christov, L. (2001). Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. **Biotechnol. Lett.** 23: 345-351.
- Majeau, J. A.; Brar, S. K.; Tyagi, R. D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresour. Technol.** 101: 2331-2350.
- Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.
- Mandels, M.; Parrish, F. W.; Reese, E. T. (1962). Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **J. Bacteriol.** 83: 400-408.
- Mandels, M.; Weber, J. (1969). The production of cellulases. **Adv. Chem. Ser.** 95: 391-414.
- Mandels, M. (1975). Microbial sources of cellulases. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 5: 81-105.
- Marjamaa, K.; Toth, K.; Bromann, P. A.; Szakacs, G.; Kruus, K. (2013). Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. **Enzym. Microb. Technol.** 52: 358 – 369.
- Martens-Uzunova, E. S.; Schaap, P. J. (2009). Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. **Fungal Genet Biol.** 46: 170-179.
- Martín, C.; Klinke, H. B.; Thomsen, A. B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugar cane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 426-432.
- Martinez, D.; Berka, R. M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Baker, S.E.; *et al.* (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nat. Biotechnol.** 26: 553-560.
- McCleary, B. V. (1986). Enzymatic modification of plant polysaccharides. **Int. J. Biol. Macromol.** 8: 349-354.

- Menegol, D.; Scholl, A. L.; Fontana, R. C.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. (2014a). Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel.** 133: 232-240.
- Menegol, D.; Scholl, A. L.; Fontana, R. C.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. (2014b). Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactantes. **Energ. Convers. Manage.** 88: 1252-1256.
- Merino, S. T.; Cherry, J. (2007). Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 108: 95-120.
- Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. **Biotechnol. Adv.** 26:177–85.
- Mielgo, I.; Moreira, M. T.; Feijoo, G.; Lema, J. M. (2001). A packed-bed fungal bioreactor for the continuos decolourisation of azo-dyes (Orange II). **J. Biotechnol.** 89: 99-106.
- Minic, Z.; Jouanin, L. (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. **Plant Physiol. Biochem.** 44: 435-449.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Niwa, T.; Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Koaze, Y.; Niida, T. (1970). “Nojirimycin” as a potent inhibitor of glucosidase. **Agric. Biol. Chem.** 34: 966-968.
- Novello, M.; Vilasboa, J.; Schneider, W. D. H.; Reis, L; Fontana, R. C., Camassola, M. (2014). Enzymes for second generation ethanol: exploring new strategies for the use of xylose. **RSC Advances.** 4: 21361-21368.
- Novotný, C.; Rawal, B.; Bhatt, M.; Patel, M.; Sasek, V.; Molitoris, H. P. (2001). Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. **J. Biotechnol.** 89: 113-122, 2001.

- Oda, K.; Kakizono, D.; Yamada, O.; Iefuji, H.; Akita, O.; Iwashita, K. (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 3448–3457.
- Öhgren, K.; Bura, R.; Lesnicki, G.; Saddler, J.; Zacchi G. A. (2007). Comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochem.** 42: 834–839.
- Pham, T. A.; Berrin, J. G.; Record, E.; To, K. A.; Sigoillot, J. C. (2010). Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: role of a carbohydrate-binding module. **J. Biotechnol.** 148(4): 163–170.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T.; Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.** 5: 53-63.
- Philippidis, G. (2008). **The potential of biofuels in the Americas. Energy cooperation and security in the hemisphere task force, center for hemispheric policy.** The University of Miami. 11p.
- Phillips, C. M.; Beeson, W. T.; Cate, J. H.; Marletta, M. A. (2011). Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chem. Biol.** 16(6): 1399-406
- Polizeli, M.L.; Rizzatti, A.C.; Monti, R.; Terenz, H.F.; Jorge, J.A.; Amorim, D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 67(5): 577-591.
- Popper, Z. A.; Michel, G.; Herve, C.; Domozych, D. S.; Willats, W. G.; *et al.* (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** 62: 567–90.
- Quinlan, R. J.; Sweeney, M. D.; Lo Leggio, L.; Otten, H.; Poulsen, J. C.; *et al.* (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 108:15079–84.

- Rapp, P.; Grote, E.; Wagner, F. (1981). Formation and location of 1,4- $\beta$ -glucanases and 1,4- $\beta$ -glucosidases from *Pencillium janthinellum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 41: 857–866.
- Ravalason, H.; Grisel, S.; Chevret, D.; Favel, A.; Berrin, J. G.; Sigoillot, J. C.; et al. (2012). *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. **Bioresour. Technol.** 114:589–96.
- Reddy, N.; Yang, Y. (2005). Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends Biotechnol.** 88: 797.
- Reis, L. (2011). Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em biorreatore com agitação mecânica. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Reis, L.; Fontana, R. C.; Delabona, P. S.; Lima, D. J. S.; Camassola, M.; Pradella, J. G. C.; Dillon, A. J. P. (2013). Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresour. Technol.** 146: 597-603.
- Reis, L.; Schneider, W. D. H. S.; Fontana, R. C.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2014). Cellulase and xylanase expression in response to different pH levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. **Bioenerg. Res.** 7: 60-67.
- Ribeiro, D. A.; Cota, J.; Alvarez, T. M.; Bruchli, F.; Bragato, J.; Pereira, B. M. P.; Pauletti, B. A.; Jackson, G.; Pimenta, M. T. B.; Murakami, M. T.; Camassola, M.; Ruller, R.; Dillon, A. J. P.; Pradella, J. G.; Paes Leme, A. F.; Squina, F. M. (2012). The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. **Plos One.** 7(12): 50571.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. **Nature.** 454(14): 841-845.
- Ryu, D. Y.; Mandels, M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme Microb. Technol.** 2: 91-102.
- Sanchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Adv.** 27:185–94.

Santi, L. (2005). Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. **Dissertação de mestrado**. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

Santos, F.A.; Queiróz, J.H.; Colodette, J.L.; Fernandes, S.A.; Guimarães, V.M.; Rezende, S.T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**. 15: 1-7.

Sawyers, L. (2008). The cancer biomarker problem. **Nature**. 452(7187): 548-552.

Schneider, W. D. H. S.; Reis, L.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2014). Morphogenesis and production of enzymes by *Penicillium echinulatum* in response to different carbon sources. **Biomed. Research Int.** doi: 10.1155/2014/254863.

Sharma, M.; Roni, R.; Asiya, N.; Harinder, S. O.; Bhupinder, S. C. (2011). Evaluation of glycosyl hidrolases in the secretome of *Aspergillus fumigatus* and saccharification of alkali-treated rice straw. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 163: 557-591.

Shen Y.; Zhang Y.; Ma, T.; Bao, X.; Du, F.; Zhuang, G.; *et al.* (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing beta-glucosidase. **Bioresour. Technol.** 99: 5099–103.

Silva, A. J.; Gómez-Mendoza, D. P.; Junqueira, M.; Domont, G. B.; Ximenes, E. F. F.; Sousa, M. V.; Ricart, C. A. (2012). Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. **Proteomics**. 12(17): 2729-2738.

Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial celullases. **Enzyme Microb. Technol.** 46: 541-549.

Sun, J.; Tian, C.; Diamond, S.; Glass, N. L. (2012). Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic cell**. 11(4):482-93.

Sunna, A.; Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.** 17: 39-67.

Suto, M; Tomita, F. (2001). Review: Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 305-311.

Sygmund, C.; Kracher, D.; Scheiblbrandner, S.; Zahma, K.; Felice, A. K.; *et al.* (2012). Characterization of the two *Neurospora crassa* cellobiose dehydrogenases and their connection to oxidative cellulose degradation. **Appl. Environ. Microb.** 78: 6161–71.

Takahashi, C. M.; Lima, K. G. C.; Takahashi, D. F.; Alterthum, F. (2000). Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. **J. Microb. Biotechnol.** 16: 829-834.

Tjalsma, H.; Bolhuis; Jongbloed, J. D. H.; Brons, S.; Van Diji, J. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secreto-me. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64(3): 515-547.

Tomme, P.; Creagh, A. L.; Kilburn, D. G.; Haynes, C. A. (1996). Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC.1. Binding specificity and calorimetric analysis. **Biochem.** 35 (44): 13885-13894.

Trostle, R. (2008). **Global agricultural supply and demand: factors contributing to the recent increase in food commodity prices.** USDA economic research service, report WRS-0801, Washington. 30p.

Tsang, A.; Butler, G.; Powłowski, J.; Panisko, E. A.; Baker, S. E. (2009). Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. **Fungal Genet. Biol.** 46:S153–60.

UNICA, (2014). Etanol: Inaugurada na Itália a primeira usina comercial de etanol celulósico do mundo. **Disponível (online)**  
<http://www.unica.com.br/noticia/40728229920343585770/inaugurada-na-italia-a-primeira-usina-comercial-de-etanol-celulosico-do-mundo/> (18 de abril).

Vaheri, M. P.; Vaheri, M. E. O.; Kauppinen, V. S. (1979). Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 8: 73-80.

Valencia, E.; Chambergo, F. S. (2013). Mini-review: brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genet. Biol.** 60: 9-18.

van den Brink, J.; de Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 91: 1477-1492.

Visser, H.; Joosten, V.; Punt, P. J.; Gusakov, A. V.; Olson, P. T.; Joosten, R. et al. (2011). Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. **Ind. Biotechnol.** 7: 214–223.

Vlasenko, E.; Schulein, M.; Cherry, J.; Xu, F. (2010). Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12 and 45 endoglucanases. **Bioresour. Technol.** 101(7): 2405-2411.

Xiong, H.; Weymarn, N.; Leisola, M.; Turunen, O. (2004). Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Process Biochem.** 39: 729-773.

Xiong, H.; Weymarn, N.; Turunen, O.; Leisola, M.; Pastinen, O. (2005). Xylanase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. **Bioresour. Technol.** 96: 753-759.

Zaldivar, J.; Nielsen, J.; Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 17-34.

Zhang, Y. H. P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 367.

Žifčáková, L.; Baldrian, P. (2012). Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. **Fungal Ecol.** 5: 481–490.

Zampieri, D.; Guerra, L.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2013). Secretion of endoglucanases and  $\beta$ -glycosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. **Ind. Crop. Prod.** 50: 882-886.