



ELIAS ALVES DA SILVA

**PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA
DE CACHOS VAZIOS DE DENDÊ (*Elaeis spp*) POR MACRO-
BASIDIOMICETOS: CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO
GENÔMICA**

LAVRAS - MG

2019

ELIAS ALVES DA SILVA

**PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE CACHOS VAZIOS
DE DENDÊ (*Elaeis spp*) POR MACRO-BASIDIOMICETOS: CULTIVO E
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior

Orientador

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira

Coorientador

LAVRAS - MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

da Silva, Elias Alves.

Pré-tratamento biológico da biomassa lignocelulósica de cachos
de Dendê (*Elaeis* sp.) por macro-basidiomicetos: Cultivo e
caracterização genômica / Elias Alves da Silva. - 2019.

250 p. : il.

Orientador(a): Manoel Teixeira Souza Junior.

Coorientador(a): Félix Gonçalves de Siqueira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Lignocelulose. 2. Pré-tratamento. 3. Sequenciamento de nova
geração. I. Souza Junior, Manoel Teixeira. II. de Siqueira, Félix
Gonçalves. III. Título.

ELIAS ALVES DA SILVA

**PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE CACHOS VAZIOS
DE DENDÊ (*Elaeis spp*) COM MACRO-BASIDIOMICETOS: CULTIVO E
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA**

**PRETREATMENT OF THE LIGNOCELLULOSE BIOMASS OF EMPTY FRUIT
BUNCHES (*Elaeis spp*) WITH BASIDIOMYCETES: GENOMIC
CHARACTERIZATION AND CULTURE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 25 de abril de 2019.

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira	EMBRAPA Agroenergia
Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues	EMBRAPA Agroenergia
Dra. Amanda Araújo Souza	EMBRAPA Agroenergia
Dr. Michel Eduardo Beleza Yamagishi	EMBRAPA Informática Agropecuária

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior
Orientador

LAVRAS - MG

2019

*À minha mãe Aparecida pelo amor, carinho e incentivo em todas as etapas.
Ao meu pai Francisco pelo exemplo de caráter, dedicação e determinação.
À minha esposa Vivianny por seu amor, minha fonte de inspiração.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por conduzir-me em cada momento de minha existência, por proporcionar sabedoria, discernimento e aprendizagem. Toda honra e toda glória sejam dadas ao Senhor.

À minha esposa Vivianny por seu amor, carinho, companheirismo, paciência, incentivo, contribuições... sua existência torna tudo mais fácil, me inspira e me dá segurança em cada novo desafio. Te amo muito!

Aos meus pais Francisco e Aparecida que desde muito cedo, mostraram-me a importância de se agarrar às oportunidades e seguir em frente, também, o exercício de olhar para trás, e lembrar dificuldades, dessa forma, aprendi a valorizar o presente e sonhar com o futuro.

Aos meus irmãos Leandro e Willian pelo companheirismo, pela força e por acreditarem em minhas escolhas. Por estarem zelando por nossos pais e se fazendo presentes nos momentos em que me encontrei distante. Amo muito vocês.

À universidade Federal de Lavras pelas oportunidades oferecidas, pela qualidade que oferece em seus cursos de pós-graduação, proporcionando crescimento pessoal e profissional.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de ingresso no doutorado. Ao professor Dr. Luciano Paiva (coordenador) e Rossilvânia (secretária), por conduzirem as atividades do programa com dedicação, atenção e seriedade.

Agradeço ao Professor Dr. Manoel Teixeira pela orientação e amizade, pela oportunidade em ingressar na Embrapa Agroenergia. Agradeço pelos conselhos e dicas durante todo o processo. Por mostrar-me novas formas de se fazer pesquisa, a importância da disciplina, de mergulhar no estado da arte e identificar as lacunas no conhecimento. Além disso, agradeço pelo auxílio nas análises de bioinformática, por estar presente, pela boa vontade em aprender e ensinar.

Ao professor Dr. Félix Siqueira pela coorientação, pela amizade e confiança. Por acreditar no meu potencial e permitir que eu mergulhasse no maravilhoso universo dos macrofungos. Obrigado por conduzir-me a esta área incrível e desafiadora dentro da biologia, por fazer-me olhar para além do alcance dos olhos, e questionar, buscar inovação e empreender. Obrigado pelos conselhos, pelo apoio, motivação e, principalmente, pelo entusiasmo com o qual conduz a pesquisa. Grato pela inspiração!

À Embrapa Agroenergia, empresa que mudou completamente minha forma de ver a pesquisa, não só pela estrutura, mas pela sua história, pelo que representa e, principalmente, pela importância no desenvolvimento de tecnologias para a sociedade brasileira.

Agradeço aos analistas de pesquisa Thályta Pacheco, Thais Demarchi (LPB), Raquel Campanha (LQB) e André Leão (LGB) pelo apoio, pelos ensinamentos, pela orientação em cada etapa deste trabalho. A ajuda de vocês foi imprescindível em cada etapa. Graças a bagagem de conhecimento, à experiência de causa e dedicação de vocês, esta e muitas outras pesquisas são concretizadas.

Agradeço a toda a equipe da Embrapa Agroenergia (demais analistas de pesquisa, pesquisadores, analistas administrativos, colaboradores terceirizados e bolsistas) que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta e de outras pesquisas.

Às amigas que construí nos laboratórios LPB, LQB e LGB nos grupos de trabalho “*Mushroom & Biomass Biotec*”, “PD&I Palma de óleo” e em toda unidade. Obrigado pelos ensinamentos, pelo companheirismo e pela compreensão. Vocês fizeram toda a diferença durante o desenvolvimento deste trabalho. As conversas, momentos de descontração e os cafés da tarde, tornaram tudo mais fácil.

À Denpasa (Dendê do Pará S/A) pelos materiais lignocelulósicos cedidos para os experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)*

RESUMO GERAL

Na atualidade cresce a preocupação com o esgotamento dos recursos fósseis e crescente demanda energética. Fontes alternativas de energia são a chave para o desenvolvimento sustentável da sociedade. Nesse contexto, a utilização de resíduos agroindustriais para geração de energia, biocombustíveis, biopolímeros e químicos, tem incentivado muitas pesquisas. Contudo, resíduos lignocelulósicos apresentam frações altamente recalcitrantes, exigindo o uso de pré-tratamentos. Nesse sentido, uma gama de trabalhos, tem discutido alternativas ao emprego de pré-tratamentos que geram resíduos tóxicos e são dispendiosos. Entre elas, o pré-tratamento biológico com fungos de podridão branca ou macro-basidiomicetos, tem se mostrado relevante, no entanto, algumas características, como seletividade em relação a lignina, baixo consumo dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e menor tempo de colonização, definem uma linhagem promissora. Com base nisso, o presente trabalho foi elaborado objetivando-se identificar um ou mais macro-basidiomicetos para pré-tratar o cacho vazio de dendê e obter açúcares (glicose e xilose). Para isso, o trabalho foi iniciado com uma triagem de macrofungos, isolados do cerrado brasileiro, ou adquiridos em feiras, depositados na Coleção de Microrganismos e Microalgas com Aplicação na Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio). Os fungos tiveram seus extratos brutos enzimáticos avaliados em relação a atividades de enzimas lignocelulolíticas, além disso, estes extratos foram utilizados para compor coquetéis ou misturas enzimáticas e hidrolisar o cacho vazio. Em sequência, avaliou-se a seletividade de um grupo de fungos durante FES e finalmente, 2 linhagens selecionadas tiveram seus genomas sequenciados nas plataformas de nova geração *Illumina HiSeq 2500* e PacBio, montados e anotados. Avalia-se que o presente estudo, possibilitou explorar ao máximo o conhecimento acerca das capacidades enzimáticas e genéticas dos macro-basidiomicetos.

Palavras-chave: Lignocelulose. Pré-tratamento. Basidiomicetos. Sequenciamento de DNA

GENERAL ABSTRACT

At the moment there is growing concern about the depletion of fossil resources and increasing energy demand. Alternative sources of energy are the key to the sustainable development of society. In this context, the use of agroindustrial waste for energy generation, biofuels, biopolymers, and chemicals, has stimulated many types of research. However, lignocellulosic residues present highly recalcitrant fractions, requiring the use of pre-treatments. In this sense, a range of works, have discussed alternatives to the use of pre-treatments that generate toxic waste and are expensive. Among them, the biological pre-treatment with fungi of white rot or macro-basidiomycetes, however, has been shown, however, some characteristics, such as selectivity in relation to lignin, low consumption of polysaccharides (cellulose and hemicellulose) and shorter colonization time, define a promising lineage. Based on this, the present work was elaborated aiming the selection and genomic characterization of macro-basidiomycetes, for pretreatment of the empty fruit bunches, abundant lignocellulosic biomass of the palm oil agroindustry (*Elaeis* spp.) And the generation of monomers (hexoses, pentoses) and phenolic acids derived from lignin with different biotechnological applications. For this, the work was initiated with a screening of macrofungi, isolated from Brazilian cerrado, or purchased at fairs, deposited in the Collection of Microorganisms and Microalgae with Application in Agroenergy and Biorefineries (CMMAABio). The fungi had their crude enzymatic extracts evaluated in relation to the activities of lignocellulolytic enzymes; in addition, these extracts were used to compose cocktails or enzymatic mixtures and to hydrolyze the empty bunch. In sequence, the selectivity of a group of fungi during FES was evaluated and, finally, 2 selected lines had their genomes sequenced on the *Illumina HiSeq 2500* and *PacBio* new generation platforms, assembled and annotated. It is evaluated that the present study made it possible to explore as much as possible the knowledge about the enzymatic and genetic abilities of the macro-basidiomycetes, besides contributing to other knowledge and discussions.

Keywords: Lignocellulose. Pretreatment. Basidiomycetes. DNA sequencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Palma de óleo produzindo frutos.	27
Figura 2 – Produção mundial de óleo de palma (2014 a 2018).....	28
Figura 3 – Mapa do Brasil evidenciando a abrangência do zoneamento agroecológico da palma de óleo (Amazônia Legal).....	29
Figura 4 – Fluxo de material em uma usina de óleo de palma	31
Figura 5 – Representação esquemática da ação do pré-tratamento na desconstrução da biomassa lignocelulósica.	33
Figura 6 – Representação esquemática da atuação de macro-basidiomicetos sobre materiais lignocelulósicos.	36
Figura 7 – Representação esquemática da tecnologia SBS empregada no sequenciamento Illumina.....	49
Figura 8 – Visão geral da tecnologia Pacific Biosciences (PacBio).....	50
Figura 9 – Processos que antecedem obtenção de óleo de palma.	51
Figura 10 – Representação esquemática do aproveitamento de cachos vazios de dendê (óleo de palma) (Integração indústria de óleo e biorrefinaria).	52
Figura 11 – Fluxograma das etapas desenvolvidas (capítulos) no presente estudo.....	68
Figura 12 – Resíduos lignocelulósicos da agroindústria do óleo de palma.....	74
Figura 13 – Foto das avaliações de crescimento utilizando paquímetro digital.....	75
Figura 14 – Frascos com substratos lignocelulósicos e fungos em crescimento.....	76
Figura 15 – Sistema de fermentação em estado sólido (FES-1 modificado).....	77
Figura 16 – Montagem das hidrólises enzimáticas (HE).....	84
Figura 17 – Diâmetro das colônias (mm) de macro-basidiomicetos durante 11 dias de cultivo nos três meios testados.	86
Figura 18 – Mapa de calor (cores) indicando o vigor micelial durante o crescimento dos macro-basidiomicetos.....	87
Figura 19 – Fotografia de macro-basidiomicetos nos meios testados aos 11 dias.	88
Figura 20 – Crescimento de macro-basidiomicetos 15 dias após a inoculação em frascos com cacho de dendê FES-1	90
Figura 21 – Crescimento dos macro-basidiomicetos nos sistemas de fermentação em estado sólido.....	90
Figura 22 – Teores de proteínas solúveis totais dos EBEs dos macro-basidiomicetos cultivados em cacho de dendê (Sistema FES-1 modificado).	91

Figura 23 – Atividades de enzimas lignolíticas dos EBEs dos macro-basidiomicetos.	93
Figura 24 – Perfil de enzimas holocelulolíticas nos EBEs dos macro-basidiomicetos.....	95
Figura 25 – Perfil de protease nos EBEs dos macro-basidiomicetos	97
Figura 26 – Perfil de fitase nos EBEs dos macro-basidiomicetos.....	98
Figura 27 – Perfil de proteínas solúveis totais nos EBEs de <i>T. reesei</i> e <i>A. aculeatus</i>	100
Figura 28 – Perfil de enzimas holocelulolíticas nos EBEs de <i>T. reesei</i> e <i>A. aculeatus</i>	101
Figura 29 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com o coquetel 1.	103
Figura 30 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com o coquetel 2.	104
Figura 31 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com EBE de <i>Flavodon flavus</i> FPB-04 em diferentes concentrações no coquetel 1.....	108
Figura 32 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com EBE de <i>Flavodon flavus</i> FPB-04 em diferentes concentrações no coquetel 2.....	108
Figura 33 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com EBE de <i>Fomes fasciatus</i> FPB-28 em diferentes concentrações no coquetel 1.....	109
Figura 34 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com EBE de <i>Fomes fasciatus</i> FPB-28 em diferentes concentrações no coquetel 2.....	110
Figura 35 – Placa do tipo <i>deep well</i> com a mistura reacional.....	128
Figura 36 – Perdas de massa (%) da BVBF após pré-tratamento biológico com 08 linhagens de macro-basidiomicetos.	131
Figura 37 – Perdas (%) de componentes estruturais das BVBFs.	132
Figura 38 – Composição química das BVBFs restantes após o pré-tratamento biológico. ..	133
Figura 39 – Rendimento de açúcares (glicose e xilose) após sacarificação das BVBFs com extrativos.	136
Figura 40 – Rendimento de açúcares (glicose e xilose) após sacarificação das BVBFs sem extrativos.....	138
Figura 41 – Rendimento de açúcares (glicose e xilose) do CVD pré-tratado e sem pré-tratar.	141
Figura 42 – Redução (%) de substâncias fenólicas e inibitórias por EBEs de macro- basidiomicetos e ascomicetos.	143
Figura 43 – Fotografia de <i>Flavodon flavus</i> FPB-04.....	157
Figura 44 – Árvore filogenética baseada na região ITS do rDNA mostrando a posição filogenética de <i>F. flavus</i> FPB-04.	165
Figura 45 – Qualidade do DNA genômico de <i>F. flavus</i>	166
Figura 46 – Distribuição do tamanho das sequências com o sequenciamento PacBio	167

Figura 47 – Resumo das etapas executadas no Blast2GO/OmicsBox	169
Figura 48 – Resultado da busca por similaridade das sequências de <i>F. flavus</i> contra sequências da base de dados NCBI.	170
Figura 49 – Número de sequências pertencentes a uma família IPS específica.....	171
Figura 50 – Número de sequências que pertencem a um domínio IPS específico.....	172
Figura 51 – Número de sequências pertencentes a uma repetição IPS específica	172
Figura 52 – Distribuição de sítios <i>InterProScan</i>	173
Figura 53 – Domínios <i>InterProScan</i> recuperados da base de dados Pfam.	173
Figura 54 – Distribuição do número de anotações	174
Figura 55 – Anotação de ontologia genética (GO).....	175
Figura 56 – Resultado da análise de categorização funcional (BP).	175
Figura 57 – Resultado da análise de categorização funcional (CC).....	176
Figura 58 – Resultado da análise de categorização funcional (MF).....	176
Figura 59 – Resultado da análise de categorização funcional (CC).....	177
Figura 60 – Distribuição da anotação das classes enzimáticas (inglês, <i>Enzyme codes</i> - EC)	178
Figura 61 – Diagrama de Venn de <i>CAZymes</i> previstas em <i>F. flavus</i> a partir de três ferramentas / bases de dados <i>HMMER</i> , <i>Diamond</i> e <i>Hotpep</i>	179
Figura 62 – Enzimas ativas de carboidratos (<i>CAZymes</i>) do genoma de <i>F. flavus</i>	180
Figura 63 – Enzimas ativas de carboidratos (<i>CAZymes</i>) em <i>F. flavus</i> FPB 04 e outras espécies de fungos.....	181
Figura 64 – Número de <i>CAZymes</i> no genoma de <i>F. flavus</i>	182
Figura 65 – Número de <i>CAZymes</i> família AA no genoma de <i>F. flavus</i>	183
Figura 66 – Número de <i>CAZymes</i> família CE no genoma de <i>F. flavus</i>	184
Figura 67 – Número de <i>CAZymes</i> família PL no genoma de <i>F. flavus</i>	185
Figura 68 – Imagem do macro-basidiomiceto <i>Fomes fasciatus</i> FPB-28.....	200
Figura 69 – Árvore filogenética baseada na região ITS do rDNA mostrando a posição filogenética de <i>F. fasciatus</i> FPB-28.	206
Figura 70 – Qualidade do DNA obtido.	207
Figura 71 – Distribuição do tamanho das sequências com o sequenciamento <i>PacBio</i>	208
Figura 72 – Resumo das etapas executadas no <i>Blast2GO/OmicsBox</i>	209
Figura 73 – Resultado da busca por similaridade entre as sequências de proteínas de <i>F. fasciatus</i> e aquelas depositadas no NCBI.	210
Figura 74 – Número de sequências de proteínas pertencentes a uma família IPS específica.	211

Figura 75 – Representação do número de sequências proteicas que pertencem a um domínio IPS específico.....	212
Figura 76 – Número de sequências proteicas pertencentes a uma repetição IPS específica. .	212
Figura 77 – Distribuição de sítios <i>InterProScan</i>	213
Figura 78 – Domínios <i>InterProScan</i> recuperados na base de dados <i>FPrintScan</i>	213
Figura 79 – Distribuição do mapeamento <i>gene ontology</i> (GO).....	214
Figura 80 – Distribuição do número de anotações (Termos GO) recuperadas dos diferentes bancos de dados.	214
Figura 81 – Distribuição da anotação de ontologia genética (GO)	215
Figura 82 – Resultado da análise de categorização funcional das proteínas (BP).	216
Figura 83 – Resultado da análise de categorização funcional das proteínas (CC).....	216
Figura 84 – Resultado da análise de categorização funcional das proteínas (MF).....	217
Figura 85 – Distribuição da anotação das classes enzimáticas (<i>Enzyme codes</i> - EC).	218
Figura 86 – Diagrama de Venn de CAZymes previstas em <i>F. fasciatus</i>	219
Figura 87 – Enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) do genoma de <i>F. fasciatus</i>	220
Figura 88 – Número de CAZymes em <i>F. fasciatus</i>	221
Figura 89 – Número de CAZymes família AA em <i>F. fasciatus</i>	222
Figura 90 – Número de CAZymes família CE em <i>F. fasciatus</i>	223
Figura 91 – Número de CAZymes PL em <i>F. fasciatus</i>	224

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de pré-tratamentos empregados em biomassas lignocelulósicas (continua).	34
Tabela 2 – Efeitos de pré-tratamentos biológicos com diferentes macro-basidiomicetos e em diferentes biomassas.	39
Tabela 3 – Estudos envolvendo o aproveitamento do cacho de dendê para obtenção de bioprodutos. (Continua)	40
Tabela 4 – Genes de oxirredutases obtidos em 14 genomas de macro-basidiomicetos	47
Tabela 8 – Características Genômicas do basidiomiceto <i>F. flavus</i>	167
Tabela 9 – Espécies pertencentes a família Agaricomycetes que tiveram os genomas sequenciados e publicados nos últimos 5 anos.	168
Tabela 10 – Características Genômicas do basidiomiceto <i>F. fasciatus</i>	208

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL	Microlitros
ϵ	Coefficiente de extinção molar
g	Gramas
g.L	Gramas por litro
mg	Miligramas
mg.mL	Miligrama por mililitros
mg.g	Miligrama por grama
mL	Mililitros
m/v	massa/volume
m/m	massa/massa
v/v	Volume/volume
Atm	Atmosfera padrão

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividades auxiliares
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
AFEX	<i>Ammonia fibre expansion</i>
AH	Autohidrólise
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BD	Borra do decantador de óleo de dendê
BDA	Batata dextrose ágar
BioAH	Pré-tratamento biológico + hidrotérmico (autohidrólise)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRF	<i>Brown rot fungi</i>
BSA	Albumina sérica bovina
BVBF	Biomassa vegetal (cacho vazio de dendê) com biomassa fúngica
CA	Cacho vazio de dendê + ágar
CBA	Cacho vazio de dendê + borra do decantador + ágar
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enzymes</i>
CBM	Módulo de ligação a carboidratos
CBP	<i>Consolidated bioprocessing</i>
CE	Esterases de carboidratos
CMC	Carboximetilcelulose
CMMAABio	Coleção de microrganismos e microalgas aplicados a agroenergia e biorrefinarias
CPB	Cacho pré-tratado biologicamente
CST	Cacho sem pré-tratar
CVD	Cacho vazio de dendê
CVD-AH	Cacho vazio de dendê pré-tratado hidrotermicamente (autohidrólise)
DNS	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
EBE	Extrato bruto enzimático
EBEc	Extrato bruto enzimático concentrado
EC	Enzimas comerciais (<i>Celluclast</i> + <i>Cellobiase</i>) Capítulos 2 e 3
EC	<i>Enzyme Commission</i> (Capítulos 4 e 5)
FES	Fermentação em estado sólido
FPase	<i>Filter Paper Celulases</i>
FPB	Fungos de podridão branca

FS	Fermentação submersa
GH	Glicosil-hidrolases ou hidrolases de glicosídeos
GO	<i>Gene Ontology</i>
GT	Glicosil-transferases
HE	Hidrólise enzimática
HHF	<i>Hybrid hydrolysis and fermentation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LGB	Laboratório de genética e biotecnologia
LiP	Peroxidase de lignina
LPB	Laboratório de processos bioquímicos
LPMO	<i>Lytic polysaccharide monooxygenases</i>
LQB	Laboratório de química de biomassas e biocombustíveis
MnP	Peroxidase de Manganês
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nd	Não determinado
PEG	Polietilenoglicol
PL	Liase de polissacarídeo
POME	<i>Palm oil mill effluent</i>
Pox	Peroxidase
rpm	Rotações por minuto
SLC	Seletividade Lignina/Celulose
SLH	Seletividade Lignina/Holocelulose
SMS	<i>Spent mushroom substrate</i>
SSF	<i>Simultaneous saccharification and fermentation</i>
TCA	Ácido tricloroacético
(Tr+Aa)	<i>Trichoderma reesei + Aspergillus aculeatus</i>
UI	Unidades internacionais
VP	Peroxidases versáteis
WRF	White rot fungi
ZAE	Zoneamento agroecológico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	25
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1 Aspectos socioeconômicos da produção de dendê no Brasil e no mundo	27
2.2 O que fazer com o cacho vazio da agroindústria do dendê?	30
2.3 Aproveitamento de biomassas lignocelulósicas.....	32
2.4 Desafios e inovações no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos.....	33
2.5 Possibilidades do aproveitamento do cacho vazio de dendê.....	40
2.6 Fungos de podridão branca: Modelos biotecnológicos para quebra da lignocelulose e agregação de valor em resíduos	43
2.7 Sequenciamento genômico de macro-basidiomicetos.....	48
2.8 Contexto da agroindústria do óleo de palma e oportunidades para pré-tratamento biológico do CVD com macro-basidiomicetos	51
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54
REFERÊNCIAS	55
3 OBJETIVOS	66
3.1 Geral	66
3.2 Específicos	66
4 ESTRUTURA DA TESE	67
CAPÍTULO 2 – Seleção de macro-basidiomicetos para hidrólise enzimática do cacho de dendê.....	69
1 INTRODUÇÃO	72
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.2 Linhagens de fungos macro-basidiomicetos.....	74
2.3 Substratos lignocelulósicos	74
2.4 Cultivos: crescimento e vigor micelial	75
2.4.1. Cultivo em placas: meio ágar enriquecido com substratos lignocelulósicos:.....	75

2.4.2 Cultivo em frascos de vidro: meio com substratos lignocelulósicos.....	76
2.5 Avaliação da produção de enzimas lignocelulolíticas em cultivo FES por macro-basidiomicetos	76
2.5.1 Extratos brutos enzimáticos (EBE).....	77
2.6 Combinação de EBE de macro-basidiomicetos com EBE de fungos ascomicetos e enzimas comerciais para hidrólise do cacho de dendê pré-tratado hidrotermicamente	81
2.6.1 Pré-tratamento hidrotérmico do cacho vazio de dendê	82
2.6.2 Cultivo, obtenção de extratos brutos enzimáticos (EBE) e determinação do teor de proteínas solúveis e atividades de holocelulases dos ascomicetos <i>T. reesei</i> e <i>A. aculeatus</i>	82
2.6.3 Efeito da adição de EBE de macro-basidiomicetos em combinação com extrato celulolítico ou enzimas comerciais na hidrólise do CVD-AH.....	83
2.7 Efeito da concentração de EBE de macro-basidiomicetos nas misturas com EBE de ascomicetos ou enzimas comerciais.....	84
2.8 Quantificação de glicose e xilose por HPLC e determinação do rendimento de glicose e xilose	85
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1 Crescimento e vigor micelial em meio ágar enriquecido	86
3.2 Crescimento dos macro-basidiomicetos cultivados em sistema FES com substratos lignocelulósicos	89
3.3 Proteínas solúveis totais dos macro-basidiomicetos	91
3.4 Enzimas ligninolíticas – macro-basidiomicetos	92
3.5 Enzimas celulolíticas – macro-basidiomicetos	94
3.6 Atividade proteolítica – macro-basidiomicetos.....	96
3.7 Atividade de fitases - macro-basidiomicetos	98
3.8 Proteínas totais e enzimas celulolíticas dos EBEs - ascomicetos <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus aculeatus</i>	100

3.9 Coquetéis ou combinações de extratos enzimáticos de fungos macro-basidiomicetos e ascomicetos.....	102
3.10 Efeito da concentração de EBE dos macro-basidiomicetos <i>Flavodon flavus</i> FPB-04 e <i>Fomes fasciatus</i> FPB-28 na mistura com EBE de ascomicetos ou enzimas comerciais.....	107
4 CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS	113
CAPÍTULO 3 – Caracterização do cacho vazio de dendê após pré-tratamento	
biológico com macro-basidiomicetos	122
1 INTRODUÇÃO	125
2 MATERIAL E MÉTODOS	126
2.1 Pré-tratamento e caracterização das biomassas lignocelulósicas	126
2.2 Sacarificação das BVBFs com enzima comercial	127
2.3 Combinações de pré-tratamentos biológico e hidrotérmico	127
2.4 Avaliação de EBEs de macro-basidiomicetos e ascomicetos na remoção de compostos fenólicos e inibidores	128
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
3.1 Composição dos resíduos lignocelulósicos da dendecultura	130
3.2 Perdas de massa final dos componentes vegetais – metabolismo microbiano	130
3.3 Perdas de componentes (celulose, hemicelulose e lignina) das BVBFs.....	131
3.4 Composições das BVBFs.....	133
3.5 Sacarificação das BVBFs	136
3.6 Sacarificação das BVBFs livres de extrativos	138
3.7 Combinações de pré-tratamentos e hidrólise do CVD.....	139
3.8 Avaliação de EBEs de macro-basidiomicetos e ascomicetos na remoção de compostos fenólicos e inibidores	142
4 CONCLUSÃO.....	145
REFERÊNCIAS	146

CAPÍTULO 4 – Sequenciamento, montagem <i>de novo</i> e anotação funcional do genoma de <i>Flavodon flavus</i> FPB-04.....	150
1 INTRODUÇÃO	153
2 MATERIAL E MÉTODOS	155
2.1 Estimativa taxonômica dos macro-basidiomicetos.....	155
2.1.1 Extração do DNA genômico	155
2.1.2 Amplificação de fragmentos por PCR (Reação em cadeia da polimerase), purificação, sequenciamento e alinhamento em bases de dados	156
2.1.3 Construção de árvore filogenética	157
2.2 Linhagem fúngica selecionada, condições de cultivo e obtenção de micélio	157
2.3 Obtenção do DNA genômico.....	158
2.4 Preparos das bibliotecas e sequenciamento na plataforma <i>Illumina (HiSeq 2500)</i>..	159
2.5 Preparos das bibliotecas e sequenciamento na plataforma <i>PacBio</i>	159
2.6 Análises de qualidade das sequências obtidas com a plataforma <i>Illumina</i>.....	159
2.7 Montagem híbrida do genoma de <i>Flavodon flavus</i>.....	160
2.8 Anotação estrutural e predição de genes.....	160
2.9 Anotação Funcional.....	160
2.9.1 Códigos Enzimáticos (EC)	162
2.9.2 Identificação de enzimas ativas de carboidratos <i>CAZymes</i>	162
2.9.3 RNAs funcionais	162
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	163
3.1 Estimativa taxonômica de basidiomicetos.....	163
3.1 Filogenia de <i>Flavodon flavus</i>.....	164
3.2 Qualidade do DNA genômico	166
3.3 Qualidade das sequências após o sequenciamento na plataforma <i>Illumina</i>	166
3.4 Sequências obtidas com o sequenciamento <i>PacBio</i>	166
3.5 Montagem híbrida	167
3.6 Anotação estrutural do genoma de <i>F. flavus</i>.....	169

3.7 Classificação funcional das proteínas preditas	171
3.8 Mapeamento de Ontologia Genética.....	174
3.9 Anotação de ontologia genética	174
3.10 Códigos enzimáticos (EC)	177
3.11 CAZymes presentes no genoma de <i>Flavodon flavus</i> FPB 04	179
3.11.1 Hidrolases de glicosídeos (GHs)	181
3.11.2 Glicosil-transferases (GTs)	182
3.11.3 Atividades Auxiliares (AAs)	183
3.11.4 Módulos de ligação a carboidratos (CBMs).....	184
3.11.5 Esterases de carboidratos (CEs).....	184
3.11.6 Liasas de polissacarídeos (PLs)	185
4 CONCLUSÃO.....	187
REFERÊNCIAS	188
CAPÍTULO 5 – Sequenciamento, montagem e anotação funcional <i>de novo</i> do genoma de <i>Fomes fasciatus</i> FPB-28.....	195
1 INTRODUÇÃO	198
2 MATERIAL E MÉTODOS	200
2.1 Construção de árvore filogenética	200
2.2 Linhagem fúngica, condições de cultivo e obtenção de micélio.....	200
2.3 Obtenção do DNA genômico.....	201
2.4 Preparo das bibliotecas e sequenciamento na plataforma <i>Illumina</i>	202
2.5 Preparo das bibliotecas e sequenciamento na plataforma <i>PacBio</i>	202
2.6 Análises de qualidade das sequências obtidas com a plataforma <i>Illumina</i>	202
2.7 Montagem híbrida do genoma de <i>Fomes fasciatus</i>	203
2.8 Anotação estrutural e predição de genes.....	203
2.9 Anotação Funcional.....	203
2.9.1 Códigos Enzimáticos (EC)	205

2.9.2 Identificação de enzimas ativas de carboidratos <i>CAZymes</i>	205
2.9.3 RNAs funcionais	205
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	206
3.1 Filogenia de <i>Fomes fasciatus</i>	206
3.2 Qualidade do DNA genômico	207
3.3 Qualidade das sequências após o sequenciamento <i>Illumina HiSeq 2500</i>	207
3.4 Sequências PacBio	208
3.5 Montagem híbrida	208
3.6 Anotação estrutural do genoma de <i>Fomes fasciatus</i>	209
3.8 Mapeamento de ontologia genética	214
3.9 Anotação de ontologia genética	215
3.10 Anotação das classes enzimáticas	217
3.11 <i>CAZymes</i> preditas do genoma de <i>F. fasciatus</i>	219
3.11.1 Glicosil-hidrolases (GHs)	220
3.11.2 Glicosil-transferases (GTs)	221
3.11.3 Atividades Auxiliares (AAs)	222
3.11.4 Módulos de ligação a carboidratos (CBMs)	222
3.11.5 Esterases de carboidratos (CEs).....	223
3.11.6 Liasas de polissacarídeos (PLs)	223
4 CONCLUSÃO.....	226
5 CONCLUSÃO GERAL	227
REFERÊNCIAS	228
APÊNDICES	232

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de combustíveis de origem fóssil terá um fim em breve, em função do esgotamento previsível das reservas de matéria-prima (petróleo). Além disso, as constantes emissões de dióxido de carbono na atmosfera e a relação com o aumento na temperatura global, tem deixado todos atentos. Diante disso, as alternativas para geração de energia frente as demandas crescentes, tem suscitado debates, afinal, a energia é componente chave para países em progresso (NEMATOLLAHI et al., 2016).

Neste contexto, o emprego de fontes renováveis para suprir a demanda energética tem sido amplamente discutido, principalmente em grandes economias (DAI et al., 2016). Arelados à esta questão, surgiram os pilares da bioeconomia, cujo foco é uma economia sustentável, com utilização responsável de recursos naturais e respeito ao meio ambiente (PHILP, 2015).

Com base nisso, um conceito de biorrefinaria tem visto os resíduos agroindustriais como potenciais matérias-primas renováveis. Dessa forma, estes resíduos supririam a necessidade energética em substituição àquelas de origem fóssil, levando ao desenvolvimento de uma sociedade com economia de base biológica ou circular (MOHAN; MODESTRA; et al., 2016; MOHAN; NIKHIL; et al., 2016).

Neste cenário, encontra-se a cadeia produtiva da palma de óleo (*Elaeis spp.*), uma cultura oleaginosa altamente produtiva e que apesar do alto rendimento de óleo, também gera milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos anualmente (KURNIA et al., 2016). No entanto, esta biomassa pode ser utilizada como cobertura no próprio cultivo da palma, apesar disso, o processo de degradação natural deste material é lento, podendo ocasionar poluição ambiental (SULAIMAN et al., 2011).

Estes resíduos, não possuem estrutura ou forma que possa ter aproveitamento imediato para obtenção de subprodutos, antes, devem ser submetidos a processos de pré-tratamento e assim, posterior utilização na geração de açúcares fermentescíveis a etanol, por exemplo (KRISTIANI et al., 2015; MEDINA; WOICIECHOWSKI; ZANDONA FILHO; NIGAM; et al., 2016).

Entre estes materiais, os cachos vazios do dendê EFB (*Empty fruit bunch*), resultantes da colheita e retirada dos frutos, representa uma fração da biomassa lignocelulósica com potencial utilização na produção de bioetanol devido ao seu alto teor de polissacarídeos (CHIESA; GNANSOUNOU, 2014). O fator limitante de sua

utilização, no entanto, está na sua composição estrutural da parede celular de lignina, constituinte altamente recalcitrante (PARK et al., 2013)

Por isso, o uso de pré-tratamentos se faz necessário, possibilitando, assim, o acesso ao conteúdo de celulose e sua conversão. Os métodos de pré-tratamento, alguns utilizados em escala piloto, são principalmente químicos e/ou físicos em altas temperaturas, ocasionando formação de substâncias indesejadas (inibidores químicos) que podem comprometer as etapas subsequentes (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Alternativamente, métodos de pré-tratamentos biológicos, envolvendo principalmente fungos de podridão branca (inglês, *White – rot fungi* ou WRF) ou macro-basidiomicetos, podem ser promissores (SAHA et al., 2016), pois estes organismos são capazes de degradar materiais lignocelulósicos em função da produção e liberação de enzimas ligninolíticas (lacases e peroxidases) (AGUIAR; FERRAZ, 2011; DASHTBAN et al., 2010).

Estes fungos têm sido muito estudados nos últimos anos, na busca de espécies com certo padrão de seletividade lignina/celulose (SLC) durante a desconstrução lignocelulósica (SAHA et al., 2017; SERGENTANI et al., 2016). Embora sua utilização apresente como desvantagem, a necessidade de longos períodos de incubação, genes produtores de enzimas acessórias (LPMOs – mono-oxigenases líticas de polissacarídeos e expansinas) integram o genoma da maioria dos macro-basidiomicetos, levando a produção de um repertório enzimático, potencial biotecnológico agregado, a depender das características do substrato e condições de cultivo. Isto tem incentivado estudos exploratórios do *pool* enzimático produzido durante o cultivo a fim de avaliar quais enzimas estão presentes do extrato bruto e como elas interagem com outras enzimas.

Assim, algumas iniciativas têm sugerido a adição de seus extratos brutos enzimáticos em combinações ou coquetéis hidrolíticos, para dessa forma, avaliar possíveis ações sinérgicas com celulasas e conseqüentemente, economia no emprego de altas concentrações de enzimas comerciais (WANG et al., 2018). Além disso, tem estimulado investigações genômicas e transcriptômicas a fim de conhecer com mais detalhes, os mecanismos envolvidos na seletividade e transformação da biomassa.

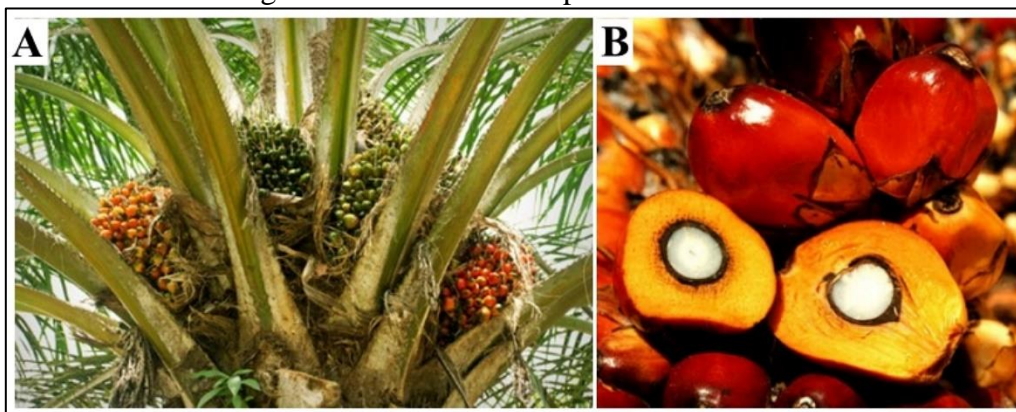
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos socioeconômicos da produção de dendê no Brasil e no mundo

A palma de óleo é uma das dezenas de espécies de palmeiras existentes nas regiões tropicais do planeta e tem ganhado destaque pela utilização de seu óleo na indústria alimentícia, cosmética e biocombustíveis/agroenergia (FIGURA 1). O óleo obtido dos frutos da palma consiste em um importante *commodity*, sendo o de maior produtividade por área cultivada, entre os óleos de origem vegetal (PATERSON et al., 2017).

O fruto do dendezeiro pode chegar a cerca de 5 cm de comprimento e alcançar peso entre 3 e 30 gramas sendo classificado como drupa do tipo sésil e elipsado. Produz dois tipos de óleo: o azeite extraído do mesocarpo (*palm oil*) e o óleo de amêndoa ou óleo de palmiste (*palm kernel*) obtido da semente (BRAZILIO et al., 2012) (FIGURA 1 A e B).

Figura 1 – Palma de óleo produzindo frutos.

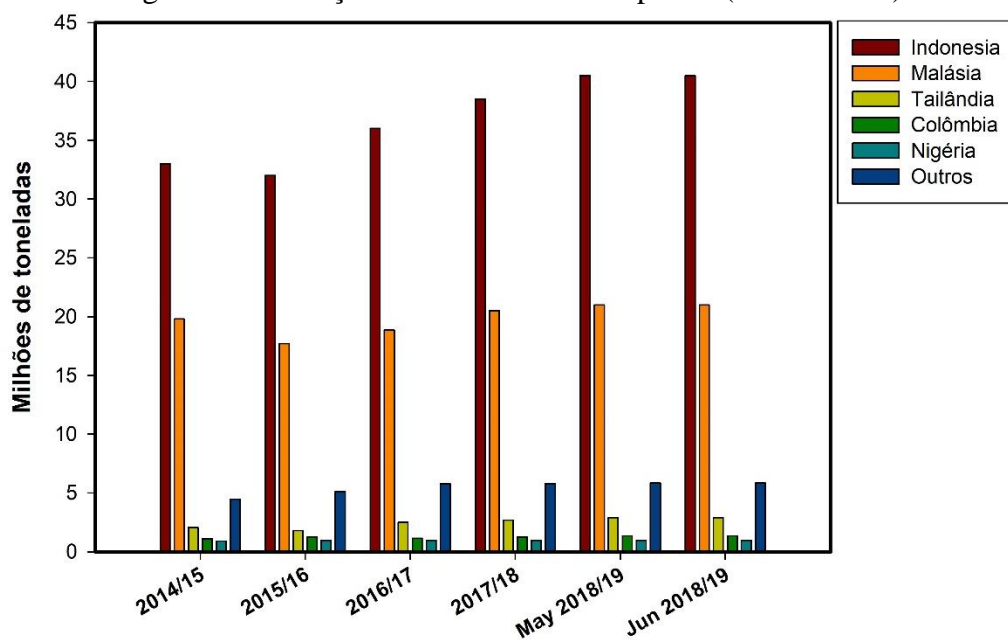


Legenda: produção de frutos em cachos (A) e frutos do dendê evidenciando a polpa amarela (mesocarpo) e a amêndoa de cor esbranquiçada ao centro (B).

Fonte: Arquivo Embrapa Agroenergia.

A produtividade do dendezeiro é de cerca de 4,87 toneladas por hectare, superando em 13 vezes a produtividade da soja, 8 vezes a do girassol e 6,5 da colza (canola) (CHANG, 2014; TYE et al., 2011). Os maiores produtores de óleo de palma no mundo são a Indonésia e Malásia (FIGURA 2), ambos países possuem grandes cultivos da palma de óleo (USDA, 2018) pois reúnem as condições edafoclimáticas ideais para a palma de óleo. Além destes, outros países equatoriais tiveram seu desenvolvimento econômico melhorado em função da indústria de óleo de palma (MARGONO et al., 2014).

Figura 2 – Produção mundial de óleo de palma (2014 a 2018).

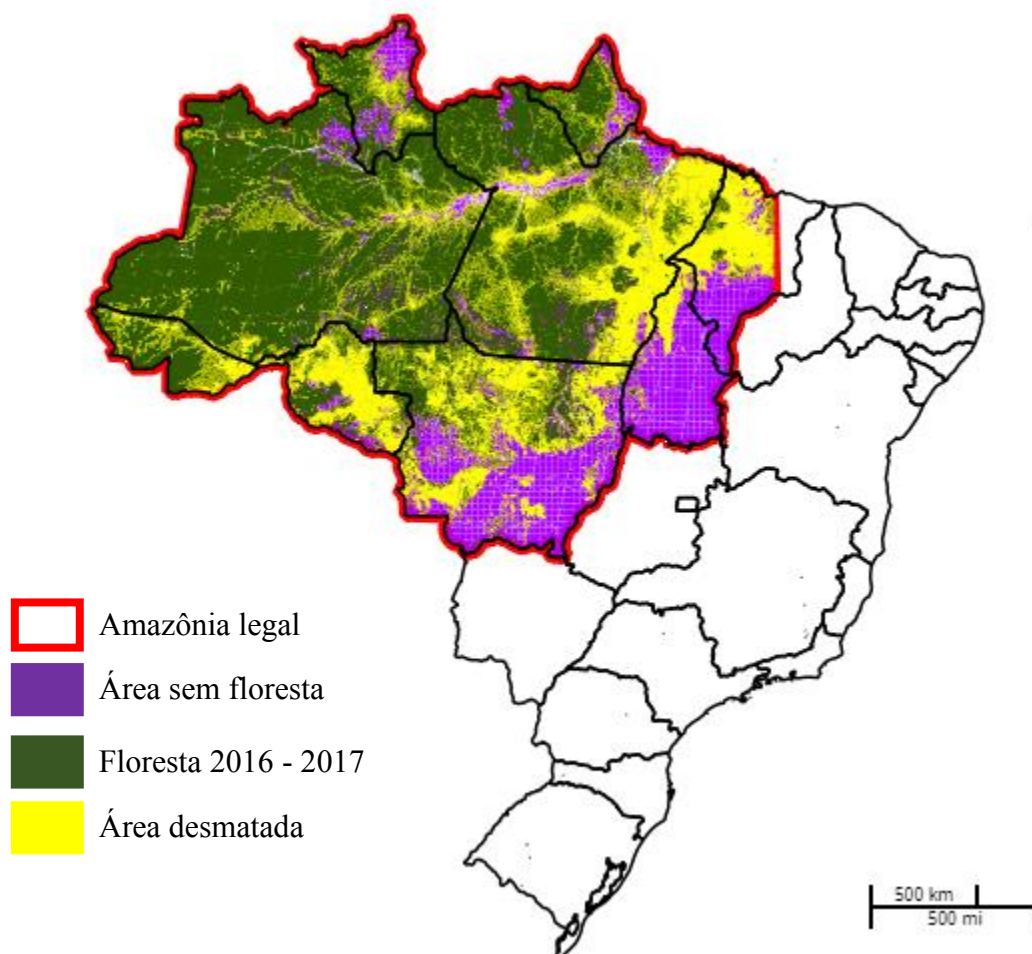


Fonte: (USDA, 2018).

No Brasil, a palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.), ganhou destaque principalmente no nordeste da Amazônia levando à formação de territórios da palma, em função de ações políticas que incentivaram seu cultivo. Há uma forte preocupação com a utilização de novas fontes energéticas, em substituição aos combustíveis fósseis, apesar disso, os produtos da palma de óleo são classificados como não renováveis em função do plantio da cultura em áreas florestais. A substituição de florestas nativas pelo plantio de palma tem ocorrido principalmente no sul da Indonésia (WICKE et al., 2011).

Neste contexto, no Brasil estabeleceu uma política nacional de biocombustíveis, como forma de enfrentamento à crise energética, buscando propor soluções sustentáveis no atendimento a crescente demanda mundial (DE MIRANDA LAMEIRA; VIEIRA; DE TOLEDO, 2015). De modo a tornar o plantio sustentável no país, o mesmo foi incentivado a partir do zoneamento agroecológico (ZAE) realizado pela EMBRAPA a pedido do governo federal (RAMALHO FILHO et al., 2010). O ZAE - Palma de óleo, consistiu em levantamento de áreas propícias ao cultivo sustentável da espécie, cuja área foco do projeto se encontra inserida no bioma amazônico (FIGURA 3).

Figura 3 – Mapa do Brasil evidenciando a abrangência do zoneamento agroecológico da palma de óleo (Amazônia Legal).



Fonte: (IBGE, 2019; INPE, 2018)

O ZAE-Palma de óleo contribuiu para a criação do Programa de Produção de Óleo de Palma Sustentável do Brasil (PPOPS) em 2010, que objetivava apoiar o cultivo da palmeira como forma de desenvolvimento econômico inclusivo. Além de diversificar as fontes de combustível usadas até então, para atender às expectativas de aumento das exigências nacionais de biodiesel (BENAMI et al., 2018). Inclusive a influência deste programa na expansão da dendecultura na atualidade, foi recentemente revisada (BENAMI et al., 2018).

Para Paterson e colaboradores (2017), o fato do Brasil apresentar um maciço setor agrícola, demonstra como a agricultura se expandirá nos países tropicais, além disso, o país apresenta as condições necessárias para a expansão da cultura de palma de óleo (áreas desmatadas com solo e clima adequados). Apesar de o país ser ainda um importador do óleo e baixo produtor, há iniciativas que podem transformar a região amazônica,

principalmente o estado do Pará em grandes produtoras de óleo de palma (VILLELA et al., 2014).

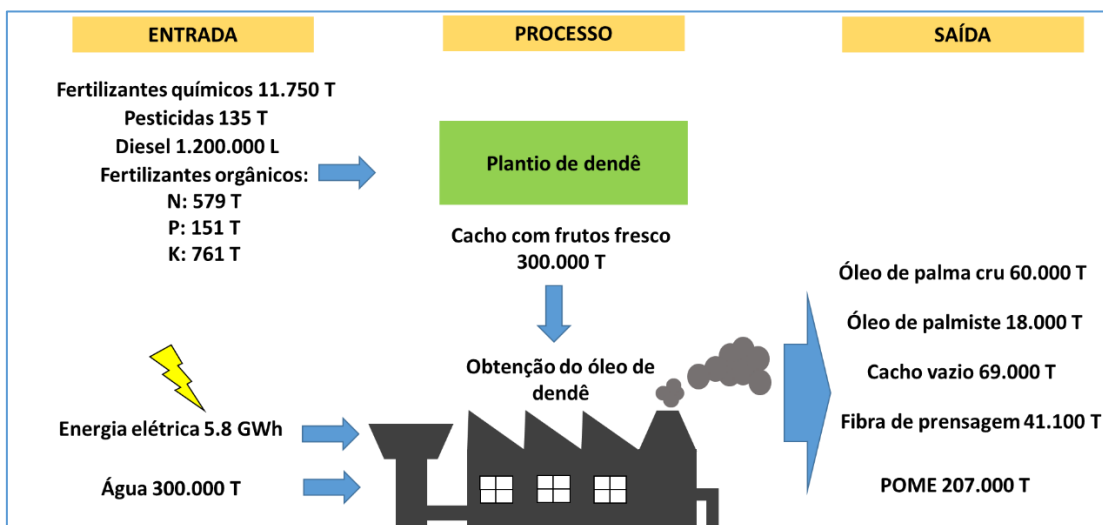
Atualmente a soja é uma cultura dominante no Brasil e é utilizada como matéria-prima para a produção de biodiesel, todavia, esse cenário tende a mudar, colocando o óleo de palma a frente até o ano de 2030 conforme estimativas governamentais de longo prazo (VILLELA et al., 2014). Contudo, apesar das vantagens (rendimento de óleo) e oportunidades (territoriais e incentivos no contexto do ZAE-Palma), a agroindústria da palma enfrenta um grande desafio que é a produção de toneladas de resíduos e efluentes, porém, todos apresentam potencial para geração de bioprodutos, e consequentemente mais dividendos ao setor.

2.2 O que fazer com o cacho vazio da agroindústria do dendê?

Tomando-se por base a produtividade de óleo de palma na Malásia em 2012 (18,8 milhões de toneladas), o volume de biomassa gerada pela indústria foi de cerca de 43,24 milhões de toneladas, um volume de material com potencial ameaça de poluição ambiental. Em virtude disso e das tendências mundiais em bioeconomia, tem-se procurado tornar as cadeias produtivas sustentáveis, levando à busca de alternativas que possam converter a biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado (HARFOUCHE et al., 2015; SULAIMAN et al., 2011; VILLELA et al., 2014).

Entre os resíduos da palma de óleo encontram-se os cachos vazios de dendê ou CVD (inglês, EFB - *Empty fruit bunch*) material lignocelulósico resultante após a retirada dos frutos. Os CVD constituem um resíduo que representa cerca de 20% do peso do cacho com frutos frescos, uma biomassa abundante obtida após o debulhamento dos frutos. A produção de 1 tonelada de óleo de palma gera cerca de 1,3 toneladas de CVD. Globalmente a indústria da palma de óleo produz cerca de 42,3 milhões de toneladas deste resíduo (FIGURA 4) (LEE, K. T.; OFORI-BOATENG, 2013; RIZAL et al., 2018; YOSHIZAKI et al., 2013).

Figura 4 – Fluxo de material em uma usina de óleo de palma



Legenda: As unidades estão representadas da seguinte forma: Tonelada (T); Litros (L) e Gigawatt-hora (GWh).

Fonte: Do autor (2019) com base em Rizal et al., (2018) e Yoshizaki et al., (2013).

O CVD já foi utilizado no passado como combustível na produção de vapor e as cinzas como corretor de solo, no entanto, a incineração tornou-se um problema devido a poluição do ar ocasionada pela formação de densa fumaça (CHANG, 2014; KERDSUWAN; LAOHALIDANOND, 2011).

Como alternativa à incineração ou utilização como cobertura morta, os CVDs podem ser utilizados como matéria-prima na produção de bioetanol, haja visto seu alto teor de polissacarídeos, principalmente celulose (ISHMAEL et al., 2016). No entanto, para isso é necessário que haja antes a quebra dos polímeros de açúcar. Este processo tem limitações como a cristalinidade da celulose e paredes celulares recalcitrantes devido a presença de hemicelulose e lignina (CHIESA; GNANSOUNOU, 2014). Por isso, faz-se necessário o emprego de pré-tratamentos nos modelos preconizados para biorrefinarias.

Os CVDs da palma de óleo são constituídos de celulose (44,2%), hemicelulose (33,5%) e lignina (20,4%), valores que podem se alterar em função da espécie plantada e das condições ambientais a que foram submetidas. Os teores médios de açúcares recuperados em processos de sacarificação compreendem cerca de 2,5% galactose e 33,1% de glicose (LEE, K. T.; OFORI-BOATENG, 2013).

2.3 Aproveitamento de biomassas lignocelulósicas

A biomassa lignocelulósica como os resíduos agrícolas, florestais entre outros, consiste em um abundante e potencial material orgânico que pode ser utilizado como matéria-prima na geração de bioenergia e biocombustíveis (LIMAYEM; RICKE, 2012; ZHENG et al., 2014). O aproveitamento integral da biomassa para geração de combustíveis, químicos e energia é o foco das biorrefinarias e da química verde. Para isso, é necessário que se crie cadeias de valores semelhantes às dos derivados do petróleo, contudo, com menor impacto ambiental (VAZ JÚNIOR, 2013).

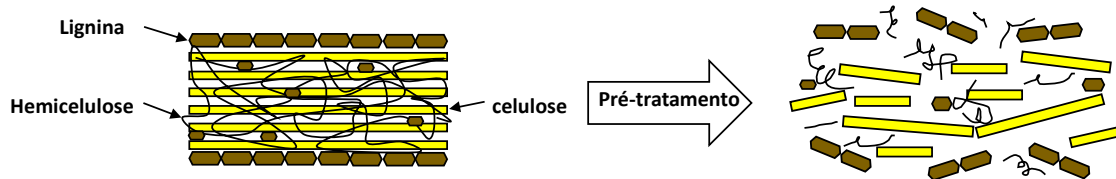
De fato, é necessário desenvolver uma economia de base biológica (utilização de insumos não fósseis) em detrimento do aumento populacional e consequente aumento na geração de resíduos. Além disso, o petróleo tem participação expressiva na mudança climática global devido ao aumento das emissões de dióxido de carbono, poluição atmosférica e chuva ácida (MUSSATTO; DRAGONE, 2016).

Resíduos lignocelulósicos são vistos como matéria-prima alternativa, uma vez que participam da captura e armazenamento de carbono levando a emissões negativas de gases de efeito estufa. As variações nos preços do petróleo somado a preocupações ambientais, reforçam o emprego da biomassa para geração de combustíveis, químicos e outros produtos de valor agregado (MUSSATTO; DRAGONE, 2016).

No levantamento realizado por Mood e colaboradores (2013) é possível identificar as proporções dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica a partir da análise de diferentes fontes vegetais. A celulose é encontrada em maior quantidade (35-50%) seguida da hemicelulose (20-35%), lignina (15-20%) e outras como extrativos e cinzas (15-20%).

Para quebrar a celulose e posterior obtenção dos açúcares fermentescíveis a etanol e outros bioprodutos, é necessário utilizar algum tipo de pré-tratamento (HSU, 2018; KIM, T. H., 2013; NANDA et al., 2014). Entre as limitações estão a presença de lignina, constituinte de alta recalcitrância e a estrutura cristalina da celulose. Contudo, empregando-se pré-tratamentos espera-se modificar a biomassa e assim, facilitar sua hidrólise e posterior fermentação (FIGURA 5).

Figura 5 – Representação esquemática da ação do pré-tratamento na desconstrução da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Do autor (2019).

2.4 Desafios e inovações no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos

Pesquisas recentes têm focado na busca de técnicas de pré-tratamento ou associações entre elas objetivando a desconstrução da parede celular e consequente aproveitamento do conteúdo do cacho de dendê, considerado como fonte promissora para produção de etanol (KIM, S. et al., 2012; KRISTIANI et al., 2015; MEDINA; WOICIECHOWSKI; ZANDONA FILHO; NIGAM; et al., 2016; PARK et al., 2013; TRIWAHYUNI et al., 2015).

Os métodos químicos e físicos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica apresentam algumas limitações como o alto consumo de energia e formação de inibidores da fermentação (BARAL; SHAH, 2014) (TABELA 1). Até o momento, foram descritas mais de cem substâncias inibidoras (aldeídos, cetonas, ácidos fracos, compostos fenólicos entre outros) (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Tabela 1 – Tipos de pré-tratamentos empregados em biomassas lignocelulósicas (continua).

Pré-tratamentos	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Físicos			
Cominuição	Redução da partícula por moagem seca ou úmida (seguida de sacarificação simultânea) ou vibratória	Facilita a sacarificação	Demorada; alto gasto energético
Irradiação	Irradiação de alta energia, micro-ondas,	-	Ineficazes, lentos, substratos específicos e caros.
Explosão a vapor	Explosão e expansão por calor ou umidade	Equipamentos comerciais disponíveis	Não supera mais que 65% do rendimento teórico de xilose.
Hidrotérmico	Cozimento em água a altas temperaturas	Não necessita do emprego de químicos; hidrolisa grande parte da fração hemicelulósica	Presença de químicos inibidores que comprometem a fermentação
Químicos			
Ácido	Utilização de ácidos diluídos (sulfúrico, nítrico, clorídrico, fosfórico e peracético)	O emprego principalmente de ácido sulfúrico - barato e eficaz. Altos rendimentos de xilose.	Corrosão de reatores, formação de gesso durante a neutralização e formação de inibidores
Alcalino	Emprego de hidróxido de sódio puro ou combinado com peróxido ou outros químicos	Mais eficaz que explosão a vapor e equivalente ao ácido. Atua na deslignificação	Varia a depender do substrato e os custos da soda cáustica são 4 vezes maiores em relação ao ácido sulfúrico
Organosolv	Utilização de solventes orgânicos (metanol, etanol ou acetona)	Promove remoção da lignina e solubilidade da hemicelulose	Complexo e caro
Amônia*	Tratamento com amônia supercrítica, ou imersão em amônia (temperatura ambiente) ou AFEX	Não produz inibidores 40 – 50 % de rendimento na sacarificação	Altos custos. Ineficaz para altos teores de lignina, baixa solubilidade de celulose e hemicelulose.
Dióxido de enxofre	Explosão a vapor catalisada por SO ₂	Em comparação com o emprego de H ₂ SO ₄ , gera menos gesso e rende mais xilose	Altamente tóxico, com desafios de segurança e saúde.

Tabela 1 – Tipos de pré-tratamentos empregados em biomassas lignocelulósicas (conclusão).

Pré-tratamentos	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Químicos			
Dióxido de Carbono*	Explosão a vapor ou sem vapor na presença de CO ₂	Rendimentos próximos a AFEX	Menos eficaz que SO ₂ e AFEX
Outros químicos*	Incluem EDTA, etilenodiamina, dimetilsulfóxido, H ₂ O ₂ mais (Mn ²⁺ , KMnO ₄ , ozônio, Na ₂ SO ₄ , dioxano e ureia)	-	Ineficazes ou muito caros
Hidrotérmico com pH fixo*	Semelhante ao hidrotérmico, contudo, com pH controlado (5,5 e 7,0)	Aumenta a digestibilidade da celulose	Não foi totalmente investigado
Biológicos			
Fermentação em estado sólido FES*	Emprego de microrganismos	Melhora digestibilidade da sacarificação; não requer uso de químicos; remove inibidores; ecologicamente correta	Processo lento. Consumo de açúcares pelo organismo.
Combinados			
2 ou mais	Tratamentos químicos sequenciais ou químico seguido de biológico ou dois físicos em sequência etc.	Melhoria a digestibilidade; Reduz o custo operacional	Requer adaptações operacionais; variável com o tipo de biomassa

Legenda: *Ainda não há relatos de testes em escala piloto.

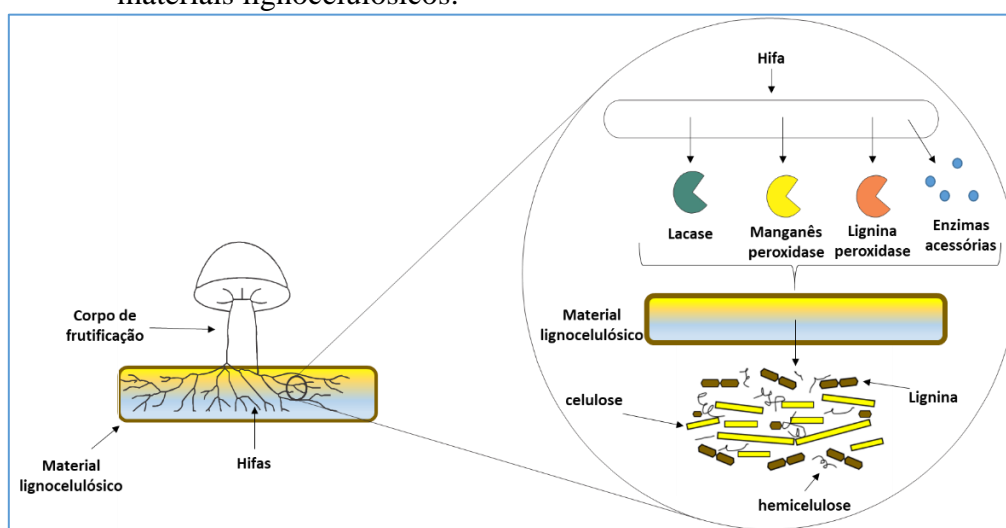
Fonte: (BAJPAI, 2016; HSU, 2018; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; LEE, J. W. et al., 2015; SINGHANIA et al., 2017)

Os aldeídos de furano, por exemplo, afetam as enzimas celulolíticas e microrganismos, os quais são utilizados em etapas subsequentes ao pré-tratamento. Além disso, estes aldeídos promovem citotoxicidade sobre os microrganismos, bloqueando a síntese de proteínas, síntese de RNA e peroxidação de membranas decorrente da formação de espécies reativas de oxigênio. A presença de 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) e furfural, ambos aldeídos de furano, também prejudicam o processo de fermentação pois a conversão em substâncias menos tóxicas é lenta nestes microrganismos (PANDEY et al., 2014)

O emprego de pré-tratamentos biológicos emerge neste cenário como alternativa à formação destes inibidores decorrentes dos processos de pré-tratamento já empregados. O pré-tratamento biológico da biomassa lignocelulósica é considerado um processo eficiente, de baixo consumo energético e ambientalmente correto (CHEN et al., 2010; HSU, 2018; KUMAR, A. K.; SHARMA, 2017).

Os pré-tratamentos biológicos são comumente realizados por macro-basidiomicetos (fungos de podridão branca ou marrom) que degradam eficientemente a lignina, celulose e hemicelulose por produzirem enzimas específicas (peroxidase de lignina, peroxidase de manganês, lacases e LPMOs). O processo tem início com a penetração da hifa do fungo pelo lúmen da célula vegetal, em seguida, o fungo secreta as enzimas convertendo os compostos da parede celular, em substâncias menores e mais fáceis de serem absorvidas (DASHTBAN et al., 2010; SÁNCHEZ, 2009) (FIGURA 6).

Figura 6 – Representação esquemática da atuação de macro-basidiomicetos sobre materiais lignocelulósicos.



Legenda: Ao colonizar a biomassa vegetal, o fungo é capaz de secretar enzimas lignolíticas e acessórias que agem sobre a recalcitrância da lignina permitindo o alcance aos polissacarídeos (Celulose e hemicelulose).

Fonte: Do autor (2019).

Apesar de muitos dos seus aspectos necessitarem de maiores elucidações, a designação por macro-basidiomicetos, pode ser compreendida como um processo multienzimático proveniente da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoredutases que tem como representantes as peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de metabólitos intermediários de baixo peso molecular (AGUIAR; FERRAZ, 2011; MILLATI et al., 2011).

Estas enzimas são classificadas por suas sequências de aminoácidos, estrutura 3D e mecanismos envolvidos na quebra dos polissacarídeos e então, agrupadas como enzimas ativas de carboidratos (*CAZymes*). Conforme pode ser verificado na base de dados *CAZymes* (*cazy.org*) (LOMBARD et al., 2014; RYTIOJA et al., 2014). Cada tipo enzimático pertence a uma família específica na base *CAZy*.

As celulasas constituem a família glicosídeo hidrolases (GH) e são responsáveis pela quebra da celulose, compreende as enzimas: β -1,4- endoglucanases (EGL), exoglucanases/celobiohidrolases (CBH). As xilanases por sua vez, possuem capacidade de hidrolisar outro carboidrato complexo como a hemicelulose com as β -1,4-endoxilânase e β -1,4-xilosidase para xilano, β -1,4-endoglucanase ativa em xiloglucano e β -1,4-glucosidase para xiloglucano e β -1,4-endomannanase e β -1,4-manosidase para (galacto-) manano. (GUPTA et al., 2016; VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011).

A degradação da lignina por macro-basidiomicetos é possível devido a ação de peroxidases lignolíticas ou ligninases que são divididas em três famílias: peroxidases de manganês (MnP EC 1.11.1.13), peroxidases de lignina (LiP, EC 1.11.1.14) e peroxidases versáteis (VP EC 1.11.1.16) (FERNÁNDEZ-FUEYO; RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2014). Este sistema lignolítico conta ainda com o auxílio de enzimas oxidativas como as lacases (EC 1.10.3.2) e aril-álcool oxidases (AAO, EC 1.1.3.7) que em conjunto rompem a estrutura da lignina abrindo-se anéis fenilo (SERGENTANI et al., 2016).

Estas enzimas têm sido estudadas com foco em diferentes aplicações biotecnológicas como produção de biocombustível, biorremediação (tratamento de águas residuais, destoxificação), indústria têxtil (descoloração de pigmentos sintéticos) e pré-tratamento de resíduos da agroindústria (RUDAKIYA; GUPTE, 2017; SCHMIDT-DANNERT, 2016; SINGH; SINGH, 2014).

Neste contexto, o uso como agentes de destoxificação em alguns resíduos como a torta da semente de pinhão manso (*Jatropha curcas*), por exemplo, tem se mostrado uma estratégia promissora, uma vez que elimina fatores antinutricionais e possibilita a

utilização destas biomassas em formulações de rações para animais ou outros produtos de valor agregado (GOMES et al., 2018).

Em relação ao pré-tratamento de grandes quantidades de biomassa, estes fungos sozinhos não conseguem quebrar toda a estrutura, incentivando o uso associado com outros fungos (consórcios microbianos) (KALYANI et al., 2013) ou com outros pré-tratamentos (combinações) (HSU, 2018) e dessa forma, alcançar maiores rendimentos de açúcares fermentescíveis.

O pré-tratamento com o macro-basidiomiceto *Pleurotus floridanus* seguido do tratamento com ácido fosfórico contribuiu para a digestibilidade da celulose do cacho no processo da hidrólise (ISHOLA et al., 2012; PELÁEZ, 2017). Posteriormente, foi demonstrado que esta combinação, levou ao aumento da concentração teórica de etanol em comparação com o pré-tratamento sem o fungo (ISHOLA; TAHERZADEH, 2014).

A habilidade destes fungos em desconstruir resíduos agroindustriais, com impactos mínimos ao ambiente, tem motivado diversos estudos (TABELA 2).

Tabela 2 – Efeitos de pré-tratamentos biológicos com diferentes macro-basidiomicetos e em diferentes biomassas.

Fungo	Biomassa	Efeitos	Referência
<i>Irpex lacteus</i>	Palha de milho	Melhoria do valor nutricional	(ZUO et al., 2018)
<i>Phlebia sp. MG-60</i>	Bambu japonês	Remoção de lignina; melhor produção de bioetanol	(TRI; KAMEI, 2018)
<i>Agaricus blazei</i>	Capim elefante	Redução de lignina; produção de açúcares redutores	(DAL PICOLLI et al., 2018)
<i>Pleurotus floridanus</i>	Cacho vazio de dendê	Redução de lignina; melhor digestibilidade (+ 60%)	(PERKEBUNAN, 2017)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Cânhamo	Aumento da hidrólise (+1,10 / 1,29 vezes)	(XIE et al., 2017)
<i>Polyporus brumalis</i>	Palha de trigo	Maior seletividade SLC e rendimento na hidrólise	(ZHOU et al., 2017)
<i>Ganoderma boninense</i>	Cacho vazio de dendê	Remoção de lignina	(JUMALI; ISMAIL, 2017)
<i>Cyathus stercoreus</i>	Palha de milho	Melhorou a sacarificação	(SAHA et al., 2016)
<i>Trametes hirsuta</i>	Palha de arroz	Degradação de lignina e melhora na hidrólise.	(MOHANRAM et al., 2015)
Consórcio fúngico	Palha	Maior liberação de açúcar.	(TAHA et al., 2015)
<i>P. ostreatus</i> / <i>P. pulmonarius</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Maior liberação de açúcar.	(CASTOLDI et al., 2014)
<i>Coriolopsis caperata</i>	Bagaço de cana	Maior liberação de açúcares (+1,5 – 2,4 vezes)	(DESWAL et al., 2014)
<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	Seringueira	Aumento de 27,67% de açúcares na hidrólise.	(NAZARPOUR et al., 2013)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Talos de milho	Aumento na sacarificação (+ 20%); produção de H ₂	(ZHAO et al., 2012)
<i>Dichomitus squalens</i>	Palha de arroz	(+58% açúcares); (+54,2% EtOH)	(BAK et al., 2010)
<i>Panus lecomtei</i>	Cacho vazio de dendê	Melhorou a sacarificação (40 – 60%)	(PELÁEZ, 2017)

2.5 Possibilidades do aproveitamento do cacho vazio de dendê

O cacho vazio de dendê é uma biomassa abundante e com potencial para geração de produtos de valor agregado como biocombustíveis, biopolímeros entre outras. Potenciais aplicações têm estimulado diferentes estudos com este resíduo da agroindústria da palma de óleo como pode ser verificado na Tabela 3.

Tabela 3 – Estudos envolvendo o aproveitamento do cacho de dendê para obtenção de bioprodutos. (Continua)

Finalidade	Estratégia utilizada	Referência
Produção de biotetanol	Pré-tratamento a vapor catalisado por NaOH seguido de SSF.	(CHOI et al., 2013)
Biogás (metano)	Pré-tratamento com (<i>N</i> -methylmorpholine- <i>N</i> -oxide) e digestão.	(PURWANDARI et al., 2013)
Produção de celulases	Como fonte de carbono no cultivo de <i>Neurospora crassa</i> S1.	(LI; NG; WU, 2014)
Bioetanol	Pré-tratamentos ácido (H ₂ SO ₄) e alcalino (NaOH) diluídos.	(CHIESA; GNANSOUNOU, 2014)
Etanol Anidro	Usina de bioetanol em escala piloto.	(JEON et al., 2014)
Produção de butanol e Hidrogênio	Sacarificação simultânea e fermentação acetona-etanol-butanol (ABE).	(IBRAHIM et al., 2015)
Ácido lático	Fermentação do hidrolisado por <i>Bacillus coagulans</i> J112.	(YE et al., 2014)
Fertilizantes orgânicos	Mistura de CVD com esterco bovino seguido de vermi-compostagem com minhocas <i>Eudrilus eugeniae</i> .	(LIM et al., 2015)

Tabela 3 – Estudos envolvendo o aproveitamento do cacho de dendê para obtenção de bioprodutos. (Continua)

Finalidade	Estratégia utilizada	Referência
Compósitos híbridos de polipropileno	Compósito preparado com cacho de dendê e fibras de vidro recicladas na proporção 70:30.	(RIVAI et al., 2014)
Biovanilina	Bioconversão do Hidrolisado alcalino do cacho triturado.	(ZULKARNAIN et al., 2018)
Fibra de carbono ativado	Ativação físico-química das fibras do cacho com ácido (H ₂ SO ₄).	(OOI et al., 2017)
Açúcares fermentescíveis e Etanol	Pré-tratamento ácido com glicerol aquoso assistido por micro-ondas seguido de Fermentação simultânea (SSF).	(FATRIASARI; ANITA; RISANTO, 2017)
Biodiesel	Hidrolisado do cacho utilizado como fonte de carbono para <i>Rhodococcus</i> sp. YHY01.	(BHATIA et al., 2017)
Biopolímeros	Extração da celulose e modificação para carboximetilcelulose (CMC) através de reação com monocloroacético em meio alcalino e etapa com adição de iodeto de lítio (LiI).	(NACEUR ABOULOULA et al., 2018)
5 hidroximetilfurfural, ácido levulínico e levulinato de etila	Despolimerização sequencial e esterificação.	(TIONG et al., 2017)
Óleo microbiano para produção de biodiesel	Cultivo de <i>Mucor plumbeus</i> no hidrolisado de cacho de dendê.	(AHMAD et al., 2017)
Ácido succínico	Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) de cacho pré-tratado por <i>Actinobacillus succinogenes</i> ATCC 55618.	(AKHTAR; IDRIS, 2017)

Tabela 3 – Estudos envolvendo o aproveitamento do cacho de dendê para obtenção de bioprodutos. (Conclusão)

Finalidade	Estratégia utilizada	Referência
Ácido láctico	Pré-tratamento ácido seguido de Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) por <i>Bacillus coagulans</i> JI12.	(JUTURU; WU, 2018)
Atividade biológica da lignina	Pré-tratamento sequencial ácido-alcálico	(MEDINA; WOICIECHOWSKI; ZANDONA FILHO; BISSOQUI; et al., 2016)
Etanol	Pré-tratamento alcálico seguido de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) com <i>Mucor indicus</i> CCUG 22424.	(CHRISTIA et al., 2016)
Substrato para produção de lipase extracelular	Fermentação em estado sólido (SSF) com <i>Trichoderma</i> sp. 1 e otimização estatística	(MUSA et al., 2017)
Substrato para produção de celulasas	Cultivo de <i>Trichoderma virens</i> UKM1 com 1% de cacho triturado como fonte de carbono.	(NGIKOH et al., 2017)
Óleo microbiano	Estudo técnico do cultivo de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Mucor plumbeus</i> em hidrolisados de cacho de dendê	(AHMAD et al., 2016)
Eletrodo de carvão ativado	Tratamento com KOH e ativação por CO ₂	(FARMA et al., 2013)
Obtenção de xilooligosacarídeos	Tratamento hidrotérmico a 180 °C durante 45 minutos em reator de 50 mL	(FERNANDEZ et al., 2018)

O emprego de microrganismos como agentes de pré-tratamento do CVD, ainda representa um desafio para as biorrefinarias, exigindo esforços na pesquisa e desenvolvimento de tecnologias, a fim de reduzir os custos dos sistemas envolvidos no processo.

Além disso, uma abordagem molecular avançada é necessária para identificar microrganismos capazes de sacarificar eficientemente resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016) ou aqueles capazes de diminuir a recalcitrância ocasionada pela presença de lignina.

2.6 Fungos de podridão branca: Modelos biotecnológicos para quebra da lignocelulose e agregação de valor em resíduos

Os fungos que produzem enzimas lignocelulolíticas incluem espécies dos filos ascomicetos e basidiomicetos (podridão branca e parda). Durante a reprodução sexuada dos basidiomicetos, hifas especializadas organizam-se formando o micélio reprodutivo (basidiocarpos) conhecidos como “cogumelos” ou “orelhas de pau”. Estas estruturas macroscópicas são perceptíveis crescendo sobre troncos de árvores e madeira em decomposição e por isso, são por vezes chamados de macro-basidiomicetos ou ainda macrofungos (PETERSEN, 2013).

Os macro-basidiomicetos possuem a habilidade de desconstruir a biomassa lignocelulósica, pois apresentam um arcabouço enzimático especializado. Estas características acompanham estes organismos desde o período pré-carbonífero, a cerca de 300 milhões de anos atrás (FLOUDAS et al., 2012; NAGY et al., 2016). Estes mecanismos de degradação estão relacionados com a preservação de grupos gênicos no decorrer dos anos até a atualidade, conferindo a estes organismos, capacidade de obtenção de energia a partir da quebra de materiais lignocelulósicos (FLOUDAS et al., 2012).

Diferentes estratégias na desconstrução da madeira levam a diferenças entre as espécies de podridão branca e carece de melhores elucidacões (FLOUDAS et al., 2015). A seletividade durante a colonização do substrato lignocelulósico é um exemplo disso, alguns basidiomicetos agem principalmente na quebra da lignina e hemicelulose, enquanto outros, promovem a quebra de todos os componentes estruturais da biomassa, levando a uma perda de carboidratos.

O pré-tratamento de resíduos do milho (*corn stover*) por meio da fermentação em estado sólido (FES) utilizando macro-basidiomicetos leva a uma maior seletividade

(razão entre perda de lignina e perda de celulose) quando o fungo *Phlebia brevispora* é utilizado (SAHA et al., 2016). O pré-tratamento também permitiu melhora na digestibilidade da biomassa no processo de hidrólise. Posteriormente, a utilização deste fungo em condições otimizadas permitiu melhores rendimentos na hidrólise e obtenção de etanol (SAHA et al., 2017).

Outro aspecto a ser considerado é que estes fungos ao colonizarem um substrato, produzem enzimas e outras substâncias de baixo peso molecular que podem apresentar ação sinérgica quando combinadas com celulases comerciais (WANG et al., 2018), sugerindo o emprego dos extratos enzimáticos desses fungos para otimização de coquetéis hidrolíticos.

Nesse sentido, já foi demonstrado que enzimas xilanolíticas e mananolíticas purificadas apresentam ação sinérgica com celulases levando a melhoria da hidrólise da lignocelulose (VÁRNAI et al., 2011). Assim, os produtos extracelulares dos macrobasidiomicetos merecem destaque pois podem ser bons doadores de substâncias químicas e enzimas que podem influenciar na efetividade de coquetéis enzimáticos para posterior aplicação em hidrólises, ou até mesmo, no tratamento de efluentes.

A descoloração do efluente contendo licor negro, oriundo do processo de obtenção de etanol 2G, foi possível com *Trametes versicolor* U97 (SARI et al., 2015). Em outro caso, enzimas secretadas por *Pleurotus sajor-caju*, foram capazes de descolorir o vermelho congo em 95% durante 1 hora nas condições avaliadas (YEHIA; RODRIGUEZ-COUTO, 2017). Também foi verificado o potencial de *Perreniporia tephropora* MUCL 47500 na descoloração dos resíduos *reactive-blue 4* e *methyl-orange* da indústria têxtil, evidenciando alta capacidade de degradação (MOUNGUENGUI et al., 2014).

De modo geral, os fungos filamentosos pertencentes às classes basidiomicetos, ascomicetos e zigomicetos tem demonstrado importante papel frente aos principais desafios globais, que envolvem o desenvolvimento de tecnologias ambientalmente favoráveis para a síntese de moléculas renováveis. O emprego como biocatalizadores em modelos de biorrefinarias, tem despertado muita atenção, pois, produzem e secretam naturalmente além de enzimas, ácidos orgânicos considerados blocos de construção na indústria química (KUMAR, S. et al., 2018).

Contudo, o que diferencia estes organismos em relação a milhares de outras espécies de fungos? Quais os fatores interferem na seletividade durante a colonização de

diferentes substratos? Estes são questionamentos, que em parte, podem ser respondidos por meio da biologia molecular (genômica e transcrito).

O número limitado de sequências de genomas destes fungos dificultou por certo tempo os estudos de proteômica e transcriptômica, fato que tem sido superado recentemente em função de muitos sequenciamentos de DNA e RNA. Dessa forma, é possível explorar melhor a resposta destes organismos na presença de diferentes biomassas, e avaliar o papel de genes sobre a produção de enzimas chave no processo de degradação de biomassa lignocelulósica.

O primeiro genoma sequenciado foi de *Phanerochaete chrysosporium* em 2004 e com isso, se tornou um fungo modelo nas pesquisas de degradação lignocelulósica por fungos da podridão branca (MARTINEZ et al., 2004; SAKURAGI et al., 2018). A partir disso, os constantes trabalhos evidenciaram uma gama de enzimas hidrolíticas, oxidativas e auxiliares, como as monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e expansinas (GUPTA et al., 2016; ZHU et al., 2016).

A seletividade em degradar celulose em detrimento da lignina é uma característica frequentemente relacionada com outros tipos de basidiomicetos (fungos de podridão parda, podridão marrom ou castanha). Esta separação, sempre se deu com base na presença ou ausência de peroxidases do tipo II (PODs) ou de enzimas celulolíticas. A partir disso, um estudo comparou genomas de 33 basidiomicetos, evidenciando que há semelhanças no mecanismo de degradação da celulose entre fungos de podridão branca e de podridão marrom, além da habilidade em quebrar lignina, também verificada em fungos de podridão marrom (RILEY et al., 2014).

Desde então, o sequenciamento e análises de genomas de basidiomicetos, vem proporcionando esclarecimentos relevantes sobre o processo de degradação da madeira, além da produção de substâncias bioativas (BRANDENBURGER et al., 2018; GRANCHI et al., 2017; RYTIOJA et al., 2014). Além disso, o acesso a tecnologias de sequenciamento de DNA e RNA, tem possibilitado um aumento de sequências em banco de dados como o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e MycoCosm (genome.jgi.doe.gov). Este último inclusive consiste em um recurso genômico integrado, fornecendo muitos dados de diferentes fungos, principalmente macro-basidiomicetos, além de ferramentas para análises (GRIGORIEV et al., 2013; GRIGORIEV et al., 2011).

Nesse contexto, a análise transcricional também fornece importantes respostas sobre o metabolismo microbiano. A expressão diferencial de determinados conjuntos de genes leva a diferentes funções celulares nos organismos, isso justifica em parte a grande

diversidade fenotípica existente entre os seres vivos (MOROZOVA; HIRST; MARRA, 2009).

Com base nisso, ao longo dos anos abordagens foram desenvolvidas para atender as investigações biológicas, como identificação de genes candidatos, detecção de RNA por *Northern blotting*, perfis de expressão por *microarrays*, *RNAseq* e técnicas de sequenciamento de nova geração. Em ascomicetos e basidiomicetos, estes estudos tem melhorado o entendimento de processos em diferentes fases de desenvolvimento e em diferentes condições de cultivo (NOWROUSIAN, 2014; OHM et al., 2014).

O sequenciamento de genomas fúngicos permitiu identificar genes envolvidos na degradação da biomassa lignocelulósica, levando a avanços nos estudos de transcriptômica e proteômica. Estudos anteriores já evidenciaram inclusive, que estes genes são especificamente induzidos pela biomassa em ascomicetos (SHAH et al., 2009).

Com base nisso, um estudo mostrou que os fungos termofílicos *Myceliophthora thermophila* e *Thielavia terrestris*, apresentaram níveis de expressão diferentes quando cultivados em cevada e palha de alfafa (BERKA et al., 2011). Já os fungos de podridão branca, exibem estratégias diferentes de decomposição, conferindo modos de atuação seletiva e não seletiva de polimerização da lignina.

Sustentando tal afirmação, o *P. chrysosporium* apresentou 15 peroxidases modificadoras da lignina, mas não *sensu stricto* lacases e *Schizophyllum comune* que possui duas lacases e ausência de peroxidase modificadora de lignina (NOWROUSIAN, 2014).

Foi confirmado ainda, que *P. chrysosporium*, também exhibe um perfil de expressão gênica diferente em função do tipo de biomassa vegetal (espécie de planta ou parte da planta processada – BVRs) em que é cultivado (WYMELENBERG et al., 2011), refletindo diretamente na produção de enzimas lignolíticas (ADAV; RAVINDRAN; SZE, 2012).

De modo geral, os macro-basidiomicetos, possuem genes que codificam enzimas responsáveis pelos mecanismos oxidativos (AA), também pelos que codificam outros grupos como as glicosil-hidrolases (GH), esterases de carboidratos (CE), auxiliares entre outros (TABELA 4). Estas famílias gênicas foram preservadas em muitas espécies destes fungos ao longo de milhões de anos (FLOUDAS et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2016).

Em virtude do que foi mencionado, percebe-se a importância dos estudos genômicos e transcritômicos envolvendo os macro-basidiomicetos, na busca do desenvolvimento de processos que possam se consolidar no contexto das biorrefinarias.

Tabela 4 – Genes de oxirredutases obtidos em 14 genomas de macro-basidiomicetos

		Genes que codificam enzimas oxidativas												
		POD	MCO	CRO	CDH	Cytb	OXO	GLP	QRD	DyP	HTP	P450	LPMO	
Basidiomicetos	Podridão branca	<i>Auricularia delicata</i>	19	10	9	1	0	3	1	4	11	16	249	19
		<i>Dichomitus squalens</i>	12	13	9	1	1	5	6	1	1	4	187	15
		<i>Punctularia strigosozonata</i>	11	13	9	1	0	2	6	3	5	8	144	14
		<i>Stereum hirsutum</i>	6	20	8	1	1	3	11	1	2	10	215	16
		<i>Trametes versicolor</i>	26	10	9	1	1	5	2	1	2	3	190	18
		<i>Fomitiporia mediterranea</i>	17	11	4	1	0	3	8	3	3	4	130	13
		<i>Heterobasidion irregulare</i>	8	17	5	1	1	3	1	2	1	5	144	10
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	16	5	7	1	1	7	3	4	0	3	149	15
	Podridão marrom	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0	4	2	1	0	4	6	3	0	6	130	4
		<i>Postia placenta</i>	1	5	3	0	0	5	5	1	2	5	250	2
		<i>Wolfiporia cocos</i>	1	5	4	0	0	4	10	1	0	5	206	2
		<i>Serpula lacrymans</i>	0	6	3	2	2	3	3	2	0	3	164	5
		<i>Coniophora puteana</i>	0	8	6	2	3	2	11	2	0	2	238	10
		<i>Fomitopsis pinicola</i>	1	7	4	0	0	5	10	1	0	4	190	4

Legenda: Genes: POD, peroxidases de classe II; MCO, multicopper oxidases; CRO, oxidases radical-cobre; CDH, celobiose desidrogenase; Cytb, citocromo b562; OXO, oxalato oxidase / descarboxilase; GLP, glicopéptidos redutores de Fe (III); QRD, quinona redutase; DyP, peroxidases corantes-descolorantes; HTP, peroxidases de heme tiolato; P450, citocromo P450; LPMO, mono-oxigenases líticas de polissacarídeo.

Fonte: (FLOUDAS et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2016; NOWROUSIAN, 2014)

2.7 Sequenciamento genômico de macro-basidiomicetos

A molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) possui as informações necessárias para o funcionamento dos processos biológicos do organismo. Para melhor entender os mecanismos que atuam nestes processos, é preciso estudar a composição da molécula de DNA, para isso, é preciso fazer uso do sequenciamento do genoma (XU; BLUHM, 2011).

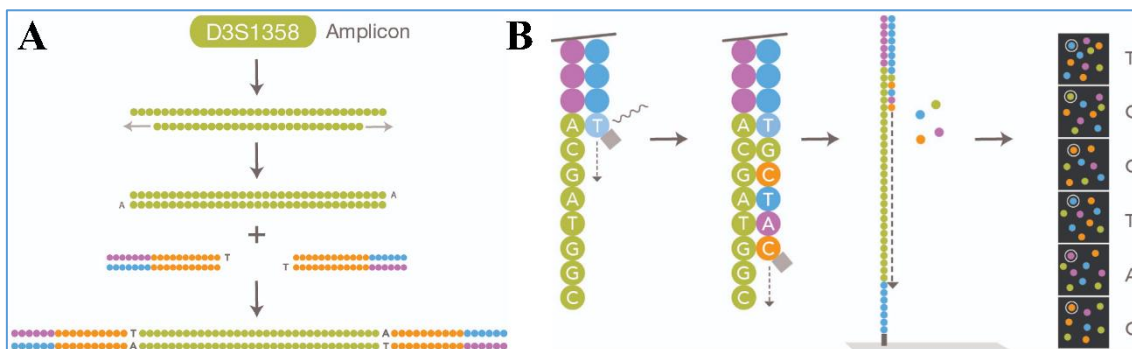
Por muito tempo, o sequenciamento genômico ficou limitado a organismos modelo de importância biomédica, além disso, era necessário um esforço conjunto para finalização de projetos de sequenciamento de genomas. Com a expansão das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, bem como o desenvolvimento de diversas ferramentas de bioinformática, houve democratização desse campo de estudo (EKBLUM; WOLF, 2014).

As tecnologias de sequenciamento de nova geração, representam um grande avanço no sequenciamento do genoma, tornando possíveis análises em larga escala (METZKER, 2010). Adicionalmente, oferecem um serviço de custo relativamente baixo e com alto rendimento, permitindo assim, análises mais abrangentes da estrutura e conteúdo dos genomas.

Neste contexto, as plataformas de nova geração usualmente empregadas na atualidade são *Illumina (HiSeq 2500)* e *Pacific Biosciences (PacBio RS II)*. Ambas proporcionam novas abordagens para o sequenciamento de DNA cada qual, apresentando vantagens e desvantagens com relação a aplicações específicas. A tecnologia *Illumina* oferece protocolos de preparação de bibliotecas compatíveis com todos os sistemas, o que tem lhe dado destaque, apresenta ainda, maior taxa de transferência de dados entre todas as plataformas e menor custo por base (YOSHINAGA et al., 2018).

O sequenciamento feito por meio da plataforma *Illumina*, é baseado na química de sequenciamento-por-síntese (SBS), que utiliza nucleotídeos terminadores reversíveis marcados com fluoróforo. Dessa forma, garante o sequenciamento base a base, permitindo dados mais precisos, sendo as leituras realizadas pela intensidade do sinal medido, durante cada ciclo, o que também minimiza a taxa de erro (VAN DIJK et al., 2014) (FIGURA 7). Os *reads* obtidos são encontrados em MiSeq e HiSeq que geram *reads* em *paired-end* com tamanho de 300bp e 150bp, respectivamente. Contudo, a plataforma *HiSeq 2500* é a que apresenta maior rendimento, gerando cerca de 4 bilhões de *reads* em uma única corrida (HODKINSON; GRICE, 2015).

Figura 7 – Representação esquemática da tecnologia SBS empregada no sequenciamento *Illumina*.



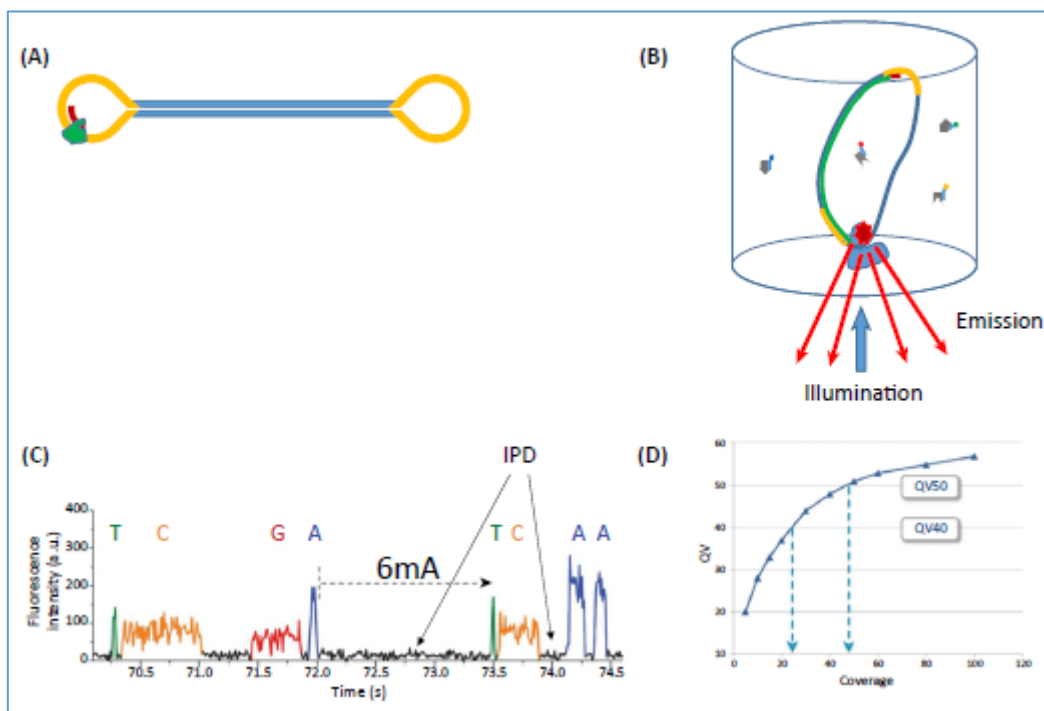
Legenda: Para construção das bibliotecas, adaptadores são ligados nas extremidades do fragmento de DNA (A). As bibliotecas (*pool* com as amostras) são injetadas em uma lâmina (*flow cell*) que apresenta uma superfície composta por óligos complementares aos adaptadores das bibliotecas. Essa lâmina é colocada no *HiSeq 2500*, onde ocorre a incorporação dos nucleotídeos marcados com fluorescência e sequenciamento por síntese base a base (*SBS sequencing*). Ao ocorrer a incorporação de um nucleotídeo, a fluorescência é excitada por lasers e captada por câmeras em cada ciclo (B).

Fonte: (<https://www.Illumina.com>).

Outra plataforma muito utilizada em sequenciamentos é a PacBio, que permite sequenciar moléculas únicas de DNA em tempo real. Isto ocorre através do monitoramento em tempo real da enzima DNA polimerase, onde as bases são detectadas no exato momento em que ocorre a síntese, isto é possível devido a marcação fluorescente (GLENN, 2011) (FIGURA 8). Esta plataforma gera *reads* longos (20kb), o que torna essa tecnologia uma ferramenta ideal para terminar ou melhorar montagem de projetos de genomas em menor tempo. Contudo, seu custo é alto (US\$ 17,02 por Mb), altas taxas de erro (14%) e menores taxas de transferência de dados quando comparada com outras plataformas (HODKINSON; GRICE, 2015).

Apesar disso, a *Pacific Biosciences* desenvolveu uma estratégia de sequenciamento consenso circular (CCST), que se baseia na estrutura circular das moléculas das bibliotecas da *PacBio*. Dessa forma, há a melhora na qualidade das leituras além de diminuição nas taxas de erro. A estrutura circular possibilita um sequenciamento contínuo e repetido de cadeia no sentido *sense* e *antisense*, podendo ser usado para gerar um único *read* consenso com alta precisão (> 99%) (KNIEF, 2014; KUMARI et al., 2017).

Figura 8 – Visão geral da tecnologia *Pacific Biosciences* (PacBio).



Legenda: (A) Preparação da biblioteca com ligação de adaptadores (amarelo) a moléculas de DNA de cadeia dupla (azul), criando moléculas circulares chamadas "SMRTbells". Posteriormente, um *primer* (vermelho) e uma polimerase (verde) são conduzidos ao adaptador. (B) Representação esquemática de um guia de ondas de modo zero (ZMW), uma câmara de observação em nano escala. O complexo polimerase-primer-SMRTbell liga-se ao fundo do ZMW. A polimerase incorpora nucleotídeos marcados com fluoróforos emitindo um sinal fluorescente na parte de baixo. Esses sinais são gravados por uma câmera em tempo real em um processo chamado "filme". (C) em um filme, não apenas a cor da fluorescência é registrada, mas também o tempo entre as incorporações de nucleotídeos, chamado de duração de impulso (IPD) (sinal em preto).

Fonte: (VAN DIJK et al., 2018).

O *Joint Genome Institute* (JGI) do departamento de energia dos EUA, por meio de parcerias internacionais, tem explorado a genômica do reino fungi (GRIGORIEV et al., 2013). Desde o início do projeto, cerca de 7600 projetos foram desenvolvidos envolvendo diferentes plataformas de sequenciamento. Do total de 67.717 organismos sequenciados, 1597 são macro-basidiomicetos (REDDY et al., 2014).

Desde então, muitos trabalhos de genoma e transcrito foram desenvolvidos em relação aos macrofungos, buscando entre outros aspectos, entender seu papel na desconstrução da lignocelulose (QIN et al., 2018). Isto reforça a importância destes organismos, frente aos desafios da obtenção de fontes alternativas para geração de energia, tendo em vista o esgotamento previsível de matérias-primas de origem fóssil.

2.8 Contexto da agroindústria do óleo de palma e oportunidades para pré-tratamento biológico do CVD com macro-basidiomicetos

Com base nas informações anteriores, é notória a necessidade do desenvolvimento de estratégias para aproveitamento do (CVD) e outros resíduos lignocelulósicos da dendecultura e torná-los matérias-primas para obtenção de produtos de valor agregado. Nesse sentido, há potencial mercado para empregar os fungos de podridão branca como pré-tratamento biológico na agroindústria de dendê (óleo de palma), principalmente em relação ao CVD.

Para obtenção do óleo de palma, o processo inicial consiste na esterilização dos cachos com os frutos a fim de evitar a ação de microrganismos produtores de lipases e promover maciez nos frutos favorecendo os processos subsequentes (JUNAIDAH et al., 2015; NANSSOU KOUTEU et al., 2016). Com isso, na indústria do óleo de palma são utilizadas grandes autoclaves para garantir a esterilização de um grande número de cachos (FIGURA 9).

Figura 9 – Processos que antecedem obtenção de óleo de palma.

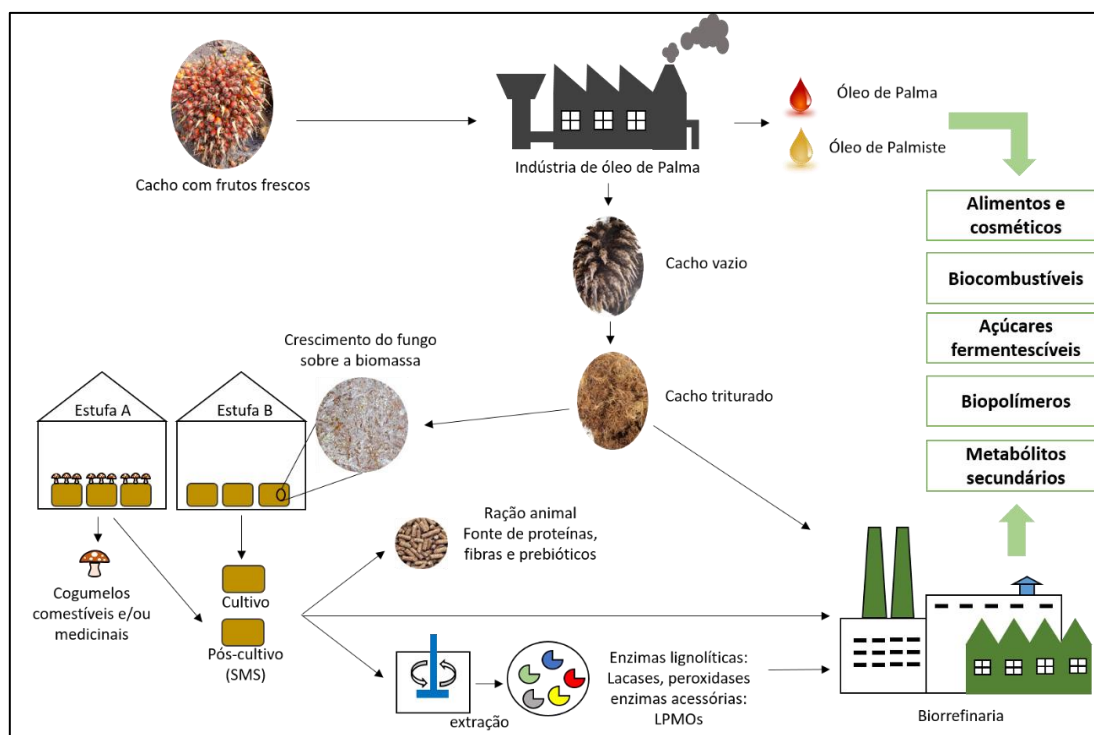


Legenda: (A) Cachos de dendê com frutos frescos; (B) Cachos sendo colocados em vagonete para esterilização; (C) Autoclave horizontal utilizada na esterilização dos cachos; (D) e (E) Cachos recém esterilizados sendo retirados das vagonetes para remoção dos frutos e (F) Cachos vazios. Fonte: Embrapa Agroenergia (Imagens capturadas com autorização da empresa Denpasa Dende do Pará S/A.).

Nos processos em escala de bancada, antes do cultivo de microrganismos é crucial a esterilização das biomassas lignocelulósicas empregadas nas fermentações em estado sólido (SSF) (DOWE; MCMILLAN, 2001). Em cultivos comerciais de cogumelos comestíveis como o cogumelo ostra ou Hiratake (*Pleurotus ostreatus*), *Pleurotus sajor-caju* e *Agaricus brasiliensis* pode ser empregado o processo de pré-compostagem e “pasteurização” (estabilização) (COLAUTO et al., 2010; MODA; HORII; SPOTO, 2005; OEI, 2003; SÁNCHEZ, 2010). De modo geral, para garantir a presença de um único organismo (cultivo axênico), a esterilização em autoclave é a mais recomendada.

Diante do exposto, se considerarmos o aproveitamento da estrutura da indústria de óleo de palma para cultivo de basidiomicetos na fibra de cachos vazios, isso pode se tornar uma alternativa para obtenção de produtos de valor agregado. Nesse caso, os cachos após a retirada dos frutos poderiam ser triturados, suplementados com outros resíduos do dendê (torta do palmiste) para ajuste da relação C/N e esterilizados para posterior inoculação de uma macro-basidiomicetos produtor de cogumelos comestíveis e obtenção de produtos/coprodutos deste sistema de cultivo fungico (FIGURA 10).

Figura 10 – Representação esquemática do aproveitamento de cachos vazios de dendê (óleo de palma) (Integração indústria de óleo e biorrefinaria).



Legenda: Cachos utilizados como substrato para cultivo de cogumelos. Ao término do cultivo, o SMS também poderá ser utilizado como matéria-prima para obtenção de diversos produtos. Alternativamente, macro-basidiomicetos podem ser utilizados para colonizar (pré-tratamento/cultivo estado solido) o cacho triturado e obtenção direta de produtos/coprodutos.

Fonte: Do autor (2019).

Para isso, algumas adaptações na indústria como a criação de salas para inoculação assépticas e câmaras climatizadas de cultivo, podem favorecer o desenvolvimento micelial dos macro-basidiomicetos inoculados nas biomassas residuais do dendê. Em se tratando de cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais, os processos de cultivo e colheita apresentam exigências diferentes dependendo da espécie. Fatores como umidade e temperatura são fundamentais para o bom desenvolvimento do fungo e isso influencia diretamente nos custos de produção conforme revisado por (DIAS, 2010).

Em outra linha, a obtenção de açúcares fermentescíveis a etanol a partir de CVD pode ser propiciada pelo pré-tratamento biológico de macro-basidiomicetos (RIZAL et al., 2018). Para isso, é preciso adotar uma cepa com seletividade para degradação de lignina, garantindo acesso aos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) (SAHA et al., 2017; SAHA et al., 2016). Esses fungos podem ainda, reduzir inibidores (compostos fenólicos) do material lignocelulósico, facilitando a fermentação dos açúcares a etanol (TIAN; FANG; GUO, 2012).

Igualmente, com a lavagem do SMS (*Spent Mushroom Substrate*) do cogumelo ou pré-tratado biológico (fibra do cacho com micélio vegetativo), pode-se obter, fração líquida, enzimas extracelulares para confecção de coquetéis hidrolíticos (WANG et al., 2018), e a fração sólida aproveitada para ração animal devido a melhoria na digestibilidade, como verificado em outras biomassas lignocelulósicas (NAYAN et al., 2018a; 2018b; ZUO et al., 2018).

As aplicações do cacho de dendê mencionadas são sugestões de como o CVD poderia ser aproveitado. Além disso, o emprego de macro-basidiomicetos bem como uso da infraestrutura da indústria de obtenção de óleo de palma, implicam na escolha da melhor cepa e adaptações operacionais. Também, é preciso otimizar as condições de cultivo e manejo objetivando escalonamento.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Adaptar as cadeias produtivas da agroindústria aos moldes da bioeconomia não é uma tarefa fácil tendo em vista as dificuldades encontradas com as partes subutilizadas da produção. A indústria do óleo de palma (*Elaeis* spp.) se mostra grande geradora de resíduos, principalmente os cachos vazios decorrentes da extração dos frutos. A utilização de pré-tratamentos pode favorecer a geração de produtos de valor agregado como açúcares fermentescíveis, químicos de interesse, ração animal etc.

Os métodos convencionais de pré-tratamento, envolvem utilização de substâncias químicas, processos físicos ou a junção de ambos, porém, estas técnicas são dispendiosas e podem levar à formação de substâncias inibidoras etc.

Neste contexto, o emprego dos fungos de podridão branca (macro-basidiomicetos) se mostra como alternativa à exploração biotecnológica devido às suas capacidades lignolíticas e oxidativas. No entanto, sem negar as desvantagens inerentes ao seu uso como pré-tratamento, a observação cuidadosa de seu crescimento, produção de enzimas e habilidades na degradação lignocelulósica, podem fornecer *insights* para otimizar a deslignificação da biomassa dos cachos vazios de dendê e consequente agregação de valor.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, N.; SULAIMAN, F. **The Oil Palm Wastes in Malaysia, Biomass Now-Sustainable Growth and Use**, Miodrag Darko Matovic (Ed.), ISBN: 978-953-51-1105-4, InTech, DOI: 10.5772/55302 2013.

ADAV, S. S.; RAVINDRAN, A.; SZE, S. K. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. **Journal of proteomiCST**, v. 75, n. 5, p. 1493-1504, 2012.

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

AHMAD, F. B. et al. Evaluation of oil production from oil palm empty fruit bunch by oleaginous micro-organisms. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 4, p. 378-392, 2016.

AHMAD, F. B. et al. Improved microbial oil production from oil palm empty fruit bunch by *Mucor plumbeus*. **Fuel**, v. 194, p. 180-187, 2017.

AKHTAR, J.; IDRIS, A. Oil palm empty fruit bunches a promising substrate for succinic acid production via simultaneous saccharification and fermentation. **Renewable Energy**, v. 114, p. 917-923, 2017.

BAJPAI, P. **Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production**. Springer, 2016. ISBN 9811006865.

BAK, J. S. et al. Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens*. **New biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 424-434, 2010.

BARAL, N. R.; SHAH, A. Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 22, p. 9151-9172, 2014.

BENAMI, E. et al. Oil palm land conversion in Pará, Brazil, from 2006–2014: evaluating the 2010 Brazilian Sustainable Palm Oil Production Program. **Environmental Research Letters**, v. 13, n. 3, p. 034037, 2018.

BERKA, R. M. et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922, 2011.

BHATIA, S. K. et al. Microbial biodiesel production from oil palm biomass hydrolysate using marine *Rhodococcus* sp. YHY01. **Bioresource technology**, v. 233, p. 99-109, 2017.

BRANDENBURGER, E. et al. Multi-genome analysis identifies functional and phylogenetic diversity of basidiomycete adenylate-forming reductases. **Fungal GenetiCST and Biology**, v. 112, p. 55-63, 2018.

- BRAZILIO, M. et al. O Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)-Revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 2, n. 1, p. 27-45, 2012.
- CASTOLDI, R. et al. Biological pretreatment of *Eucalyptus grandis* sawdust with white-rot fungi: study of degradation patterns and saccharification kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 240-246, 2014.
- CHANG, S. H. An overview of empty fruit bunch from oil palm as feedstock for bio-oil production. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 174-181, 2014.
- CHEN, S. et al. Biological pretreatment of lignocellulose: potential, progress and challenges. **Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 177-199, 2010.
- CHIESA, S.; GNANSOUNOU, E. Use of empty fruit bunches from the oil palm for bioethanol production: a thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. **Bioresource technology**, v. 159, p. 355-364, 2014.
- CHOI, W.-I. et al. Optimization of NaOH-catalyzed steam pretreatment of empty fruit bunch. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 170, 2013.
- CHRISTIA, A. et al. Ethanol production from alkali-pretreated oil palm empty fruit bunch by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 6, p. 566-572, 2016.
- COLAUTO, N. B. et al. Pasteurization of Brazilian peat for *Agaricus brasiliensis* cultivation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4Sup1, p. 1331-1336, 2010.
- DAI, H. et al. Green growth: The economic impacts of large-scale renewable energy development in China. **Applied energy**, v. 162, p. 435-449, 2016.
- DAL PICOLLI, T. et al. High-performance of *Agaricus blazei* fungus for the biological pretreatment of elephant grass. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 1, p. 42-50, 2018.
- DASHTBAN, M. et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 1, n. 1, p. 36, 2010.
- DE MIRANDA LAMEIRA, W. J.; VIEIRA, I. C. G.; DE TOLEDO, P. M. Análise da expansão do cultivo da palma de óleo no Nordeste do Pará (2008 a 2013). **Novos Cadernos NAEA**, v. 18, n. 2, 2015.
- DESWAL, D. et al. Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 264-269, 2014.
- DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.
- DOWE, N.; MCMILLAN, J. SSF experimental protocols: lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. **National Renewable Energy Laboratory (NREL) Analytical Procedures**, 2001.

EKBLOM, R.; WOLF, J. B. A field guide to whole- genome sequencing, assembly and annotation. **Evolutionary applications**, v. 7, n. 9, p. 1026-1042, 2014.

FAOSTAT, F. Agriculture Organization of the United Nations Statistic Division 2014. **Acesso em**, v. 9, 2015.

FARMA, R. et al. Preparation of highly porous binderless activated carbon electrodes from fibres of oil palm empty fruit bunches for application in supercapacitors. **Bioresource technology**, v. 132, p. 254-261, 2013.

FATRIASARI, W.; ANITA, S. H.; RISANTO, L. Microwave assisted acid pretreatment of oil palm empty fruit bunches (EFB) to enhance its fermentable sugar production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 2, p. 379-391, 2017.

FERNANDEZ, R. A. et al. Autohydrolysis of Sugarcane Bagasse and Empty Fruit Bunch from Oil Palm: Kinetic Model and Analysis of Xylo-Oligosaccharides Yield. **Chemical Engineering Transactions**, v. 65, p. 307-312, 2018.

FLOUDAS, D. et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1715-1719, 2012.

FLOUDAS, D. et al. Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 76, p. 78-92, 2015.

GLENN, T. C. Field guide to next- generation DNA sequencers. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 5, p. 759-769, 2011.

GOMES, T. G. et al. Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2510-2522, 2018.

GRANCHI, Z. et al. Genome Sequence of the Basidiomycete White-Rot Fungus *Trametes pubescens* FBCC735. **Genome Announcements**, v. 5, n. 8, p. e01643-16, 2017.

GRIGORIEV, I. V. et al. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D699-D704, 2013.

GRIGORIEV, I. V. et al. The genome portal of the department of energy joint genome institute. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D26-D32, 2011.

GUPTA, V. K. et al. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.

HARFOUCHE, A. et al. Forest biotechnology advances to support global bioeconomy. **Annals of Silvicultural Research**, v. 38, n. 2, p. 42-50, 2015.

HODKINSON, B. P.; GRICE, E. A. Next-generation sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research. **Advances in wound care**, v. 4, n. 1, p. 50-58, 2015.

HSU, T.-A. Pretreatment of biomass. In: (Ed.). **Handbook on bioethanol**: Routledge, 2018. p.179-212.

IBGE. Mapa da Amazônia Legal. 2019. Disponível em: <
<https://mapas.ibge.gov.br/tematicos/amazonia-legal.html> >. Acesso em: 15/01/2019.

IBRAHIM, M. F. et al. Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel. **Renewable Energy**, v. 77, p. 447-455, 2015.

INPE. Programa de mapeamento do desmatamento. 2018. Disponível em: <
<http://terrabrasilis.info/composer/PRODES> >. Acesso em: 10/12/2018.

ISHMAEL, U. C. et al. Statistical modeling and optimization of enzymatic pretreatment of empty fruit bunches with laccase enzyme. **Bioresources**, v. 11, n. 2, p. 5013-5032, 2016.

ISHOLA, M. M. et al. Structural changes of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) after fungal and phosphoric acid pretreatment. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14995-15012, 2012.

ISHOLA, M. M.; TAHERZADEH, M. J. Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). **Bioresource technology**, v. 165, p. 9-12, 2014.

JEON, H. et al. Production of anhydrous ethanol using oil palm empty fruit bunch in a pilot plant. **Biomass and bioenergy**, v. 67, p. 99-107, 2014.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

JUMALI, S. S.; ISMAIL, S. Ganoderma boninense Efficacy in Delignifying Oil Palm Empty Fruit Bunches. **Pertanika Journal of Science and Technology**, v. 25, p. 1-8, 2017.

JUNAIDAH, M. et al. Optimisation of sterilisation process for oil palm fresh fruit bunch at different ripeness. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, p. 275, 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C. Production of high concentration of l- lactic acid from oil palm empty fruit bunch by thermophilic Bacillus coagulans JI12. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 145-149, 2018.

KALYANI, D. et al. Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. **Fuel**, v. 107, p. 815-822, 2013.

KERDSUWAN, S.; LAOHALIDANOND, K. Renewable energy from palm oil empty fruit bunch. In: (Ed.). **Renewable energy-trends and applications**: InTech, 2011.

KIM, S. et al. Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. **Bioresource technology**, v. 109, p. 229-233, 2012.

- KIM, T. H. Pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**, p. 91-110, 2013.
- KNIEF, C. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 216, 2014.
- KRISTIANI, A. et al. Effect of combining chemical and irradiation pretreatment process to characteristic of oil palm's empty fruit bunches as raw material for second generation bioethanol. **Energy Procedia**, v. 68, p. 195-204, 2015.
- KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 7, 2017.
- KUMAR, S. et al. **Fungal Biorefineries**. Springer, 2018. ISBN 3319903799.
- KUMARI, A. et al. Impact of next-generation sequencing Technology in plant–microbe interaction study. In: (Ed.). **Microbial Applications Vol. 1**: Springer, 2017. p.269-294.
- KURNIA, J. C. et al. Advances in biofuel production from oil palm and palm oil processing wastes; A review. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 332-346, 2016.
- LEE, J. W. et al. Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: sugar recovery efficiency and structural characterization. **Bioresource technology**, v. 182, p. 296-301, 2015.
- LEE, K. T.; OFORI-BOATENG, C. **Sustainability of biofuel production from oil palm biomass**. Springer, 2013. ISBN 9814451703.
- LI, Q.; NG, W. T.; WU, J. C. Isolation, characterization and application of a cellulose-degrading strain *Neurospora crassa* S1 from oil palm empty fruit bunch. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 157, 2014.
- LIM, P. et al. A potential bioconversion of empty fruit bunches into organic fertilizer using *Eudrilus eugeniae*. **International journal of environmental science and technology**, v. 12, n. 8, p. 2533-2544, 2015.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.
- MARGONO, B. A. et al. Primary forest cover loss in Indonesia over 2000–2012. **Nature Climate Change**, v. 4, n. 8, p. 730, 2014.
- MARTINEZ, D. et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 695, 2004.

- MEDINA, J. D. C. et al. Steam explosion pretreatment of oil palm empty fruit bunches (EFB) using autocatalytic hydrolysis: A biorefinery approach. **Bioresource technology**, v. 199, p. 173-180, 2016.
- MEDINA, J. D. C. et al. Biological activities and thermal behavior of lignin from oil palm empty fruit bunches as potential source of chemicals of added value. **Industrial crops and products**, v. 94, p. 630-637, 2016.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature reviews genetiCST**, v. 11, n. 1, p. 31, 2010.
- MILLATI, R. et al. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. **BioResources**, v. 6, n. 4, p. 5224-5259, 2011.
- MODA, E. M.; HORII, J.; SPOTO, M. H. F. Edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 2, p. 127-132, 2005.
- MOHAN, S. V. et al. A circular bioeconomy with biobased products from CO₂ sequestration. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 506-519, 2016.
- MOHAN, S. V. et al. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: critical review and future perspectives. **Bioresource technology**, v. 215, p. 2-12, 2016.
- MOHANRAM, S. et al. Insights into biological delignification of rice straw by *Trametes hirsuta* and *Myrothecium roridum* and comparison of saccharification yields with dilute acid pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 76, p. 54-60, 2015.
- MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- MOROZOVA, O.; HIRST, M.; MARRA, M. A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annual review of genomiCST and human genetiCST**, v. 10, p. 135-151, 2009.
- MOUNGUENGUI, S. et al. Discoloration and biodegradation of two dyes by white-rot fungi *Perreniporia tephropora* MUCL 47500 isolated in Gabon. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 6, p. 731-741, 2014.
- MUSA, H. et al. Turning oil palm empty fruit bunch waste into substrate for optimal lipase secretion on solid state fermentation by *Trichoderma* strains. **Process Biochemistry**, v. 63, p. 35-41, 2017.
- MUSSATTO, S.; DRAGONE, G. Biomass pretreatment, biorefineries, and potential products for a bioeconomy development. In: (Ed.). **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**: Elsevier, 2016. p.1-22.

NACEUR ABOULOULA, C. et al. A novel application for oil palm empty fruit bunch: extraction and modification of cellulose for solid polymer electrolyte. **IoniCST**, p. 1-10, 2018.

NAGY, L. G. et al. Genetic bases of fungal white rot wood decay predicted by phylogenomic analysis of correlated gene-phenotype evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 1, p. 35-44, 2016.

NANDA, S. et al. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 4, n. 2, p. 157-191, 2014.

NANSSOU KOUTEU, P. A. et al. Lipase activity of tropical oilseed plants for ethyl biodiesel synthesis and their typo- and regioselectivity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 46, p. 8838-8847, 2016.

NAYAN, N. et al. Screening of white- rot fungi for bioprocessing of wheat straw into ruminant feed. **Journal of applied microbiology**, 2018a.

_____. Variation in the solubilization of crude protein in wheat straw by different white-rot fungi. **Animal Feed Science and Technology**, v. 242, p. 135-143, 2018b.

NAZARPOUR, F. et al. Evaluation of biological pretreatment of rubberwood with white rot fungi for enzymatic hydrolysis. **Materials**, v. 6, n. 5, p. 2059-2073, 2013.

NEMATOLLAHI, O. et al. Energy demands and renewable energy resources in the Middle East. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 1172-1181, 2016.

NGIKOH, B. et al. Characterisation of Cellulases and Xylanase from *Trichoderma virens* UKM1 and its Potential in Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) Saccharification. **Journal of Physical Science**, v. 28, p. 171, 2017.

NOGUEIRA, C. F. et al. From Genomes to Transcriptomes and Secretomes: A Fungal Perspective with Insights into Biorefinery Applications. **Mycology: Current and Future Developments: Fungal Biotechnology for Biofuel Production**, v. 1, p. 366, 2016.

NOWROUSIAN, M. **Fungal GenomiCST**. Springer Science & Business Media, 2014. ISBN 3642452183.

OEI, P. **Mushroom cultivation: appropriate technology for mushroom growers**. Backhuys Publishers, 2003. ISBN 9057821370.

OHM, R. A. et al. GenomiCST of wood-degrading fungi. **Fungal GenetiCST and Biology**, v. 72, p. 82-90, 2014.

OOI, C.-H. et al. Conversion and characterization of activated carbon fiber derived from palm empty fruit bunch waste and its kinetic study on urea adsorption. **Journal of environmental management**, v. 197, p. 199-205, 2017.

PANDEY, A. et al. **Pretreatment of biomass: processes and technologies**. Academic Press, 2014. ISBN 0128003960.

- PARK, J. M. et al. Efficient production of ethanol from empty palm fruit bunch fibers by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 8, p. 1807-1814, 2013.
- PATERSON, R. et al. World climate suitability projections to 2050 and 2100 for growing oil palm. **The Journal of Agricultural Science**, v. 155, n. 5, p. 689-702, 2017.
- PERKEBUNAN, M. Characteristic of oil palm empty fruit bunch pretreated with *Pleurotus floridanus*. **Menara Perkebunan**, v. 85, n. 2, p. 67-76, 2017.
- PETERSEN, Jens H. **The kingdom of fungi**. Princeton University Press, 2013.
- PURWANDARI, F. A. et al. Pretreatment of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) by N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) for biogas production: Structural changes and digestion improvement. **Bioresource technology**, v. 128, p. 461-466, 2013.
- QIN, X. et al. Deciphering lignocellulose deconstruction by the white rot fungus *Irpex lacteus* based on genomic and transcriptomic analyses. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 58, 2018.
- RAMALHO FILHO, A. et al. Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia. **Rio de Janeiro: Embrapa Solos**, 2010.
- REDDY, T. B. et al. The Genomes OnLine Database (GOLD) v. 5: a metadata management system based on a four level (meta) genome project classification. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D1099-D1106, 2014.
- RILEY, R. et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9923-9928, 2014.
- RIVAI, M. et al. Characterization of oil palm empty fruit bunch and glass fibre reinforced recycled polypropylene hybrid composites. **Fibers and Polymers**, v. 15, n. 7, p. 1523-1530, 2014.
- RIZAL, N. et al. Pre-treatment of Oil Palm Biomass for Fermentable Sugars Production. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1381, 2018.
- RYTIOJA, J. et al. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.
- SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with *Phlebia brevispora* NRRL- 13108 for enhanced enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 2, p. 365-374, 2017.
- SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.

SAKURAGI, K. et al. Secretome analysis of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* grown on ammonia-treated lignocellulosic biomass from birch wood. **Journal of Wood Science**, v. 64, n. 6, p. 845-853, 2018.

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

_____. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1321-1337, 2010.

SARI, A. A. et al. Decolorization of black liquor wastewater generated from bioethanol process by using oil palm empty fruit bunches. **Energy Procedia**, v. 68, p. 254-262, 2015.

SERGENTANI, A. G. et al. Lignocellulose degradation potential of Basidiomycota from Thrace (NE Greece). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, p. 268-277, 2016.

SHAH, P. et al. A proteomic study of pectin- degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. **ProteomiCST**, v. 9, n. 11, p. 3126-3135, 2009.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGHANIA, R. R. et al. **Waste to Wealth**. Springer, 2017. ISBN 9811074313.

SULAIMAN, F. et al. An outlook of Malaysian energy, oil palm industry and its utilization of wastes as useful resources. **Biomass and bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3775-3786, 2011.

TAHA, M. et al. Enhanced biological straw saccharification through coculturing of lignocellulose-degrading microorganisms. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3709-3728, 2015.

TIAN, X. F.; FANG, Z.; GUO, F. Impact and prospective of fungal pre- treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 335-350, 2012.

TIONG, Y. W. et al. One-pot conversion of oil palm empty fruit bunch and mesocarp fiber biomass to levulinic acid and upgrading to ethyl levulinate via indium trichloride-ionic liquids. **Journal of Cleaner Production**, v. 168, p. 1251-1261, 2017.

TRI, C. L.; KAMEI, I. The improvement of sodium hydroxide pretreatment in bioethanol production from Japanese bamboo *Phyllostachys edulis* using the white rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 133, p. 86-92, 2018.

TRIWAHYUNI, E. et al. Alkaline delignification of oil palm empty fruit bunch using black liquor from pretreatment. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 99-105, 2015.

- TYE, Y. Y. et al. Second-generation bioethanol as a sustainable energy source in Malaysia transportation sector: Status, potential and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4521-4536, 2011.
- USDA, U. S. D. O. A. **Oil seeds: World Markets and Trade**. AGRICULTURE. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>: 18 p. 2018.
- VAN DIJK, E. L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in GenetiCST**, v. 30, n. 9, p. 418-426, 2014.
- VAN DIJK, E. L. et al. The third revolution in sequencing technology. **Trends in GenetiCST**, 2018.
- VÁRNAI, A. et al. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 9096-9104, 2011.
- VAZ JÚNIOR, S. Biomassa para química verde. **Embrapa Agroenergia, Brasília**, 2013.
- VILLELA, A. A. et al. Status and prospects of oil palm in the Brazilian Amazon. **Biomass and bioenergy**, v. 67, p. 270-278, 2014.
- WANG, Y. et al. Synergistic action between extracellular products from white-rot fungus and cellulase significantly improves enzymatic hydrolysis. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 178-185, 2018.
- WICKE, Birka et al. Exploring land use changes and the role of palm oil production in Indonesia and Malaysia. **Land use policy**, v. 28, n. 1, p. 193-206, 2011.
- WYMELENBERG, A. V. et al. Gene expression of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* is significantly altered by plant species. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM. 00508-11, 2011.
- XIE, C. et al. White-rot fungi pretreatment combined with alkaline/oxidative pretreatment to improve enzymatic saccharification of industrial hemp. **Bioresource technology**, v. 243, p. 188-195, 2017.
- XU, J.-R.; BLUHM, B. H. **Fungal GenomiCST**. Springer, 2011.
- YE, L. et al. Simultaneous detoxification, saccharification and co-fermentation of oil palm empty fruit bunch hydrolysate for l-lactic acid production by *Bacillus coagulans* JI12. **Biochemical engineering journal**, v. 83, p. 16-21, 2014.
- YEHIA, R.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Discoloration of the azo dye Congo Red by manganese-dependent peroxidase from *Pleurotus sajor caju*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 222-229, 2017.
- YOSHINAGA, Y. et al. Genome sequencing. In: (Ed.). **Fungal GenomiCST**: Springer, 2018. p.37-52.

YOSHIZAKI, T. et al. Improved economic viability of integrated biogas energy and compost production for sustainable palm oil mill management. **Journal of cleaner production**, v. 44, p. 1-7, 2013.

ZHAO, L. et al. Fungal pretreatment of cornstalk with *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production. **Bioresource technology**, v. 114, p. 365-369, 2012.

ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in energy and combustion science**, v. 42, p. 35-53, 2014.

ZHOU, S. et al. Efficient biomass pretreatment using the White-rot Fungus *Polyporus Brumalis*. **Fungal GenomiCST & Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2017.

ZHU, N. et al. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 42, 2016.

ZULKARNAIN, A. et al. Alkaline hydrolysate of oil palm empty fruit bunch as potential substrate for biovanillin production via two-step bioconversion. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 1, p. 13-23, 2018.

ZUO, S. et al. Effect of *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus* pretreatment of corn stover on its improvement of the in vitro rumen fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 11, p. 4287-4295, 2018.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar 08 macro-basidiomicetos quanto a produção de enzimas lignocelulolíticas e sequenciamento, montagem e anotação dos genomas de dois macro-basidiomicetos envolvidos no processo de desconstrução da biomassa do cacho vazio de dendê/óleo de palma (CVD).

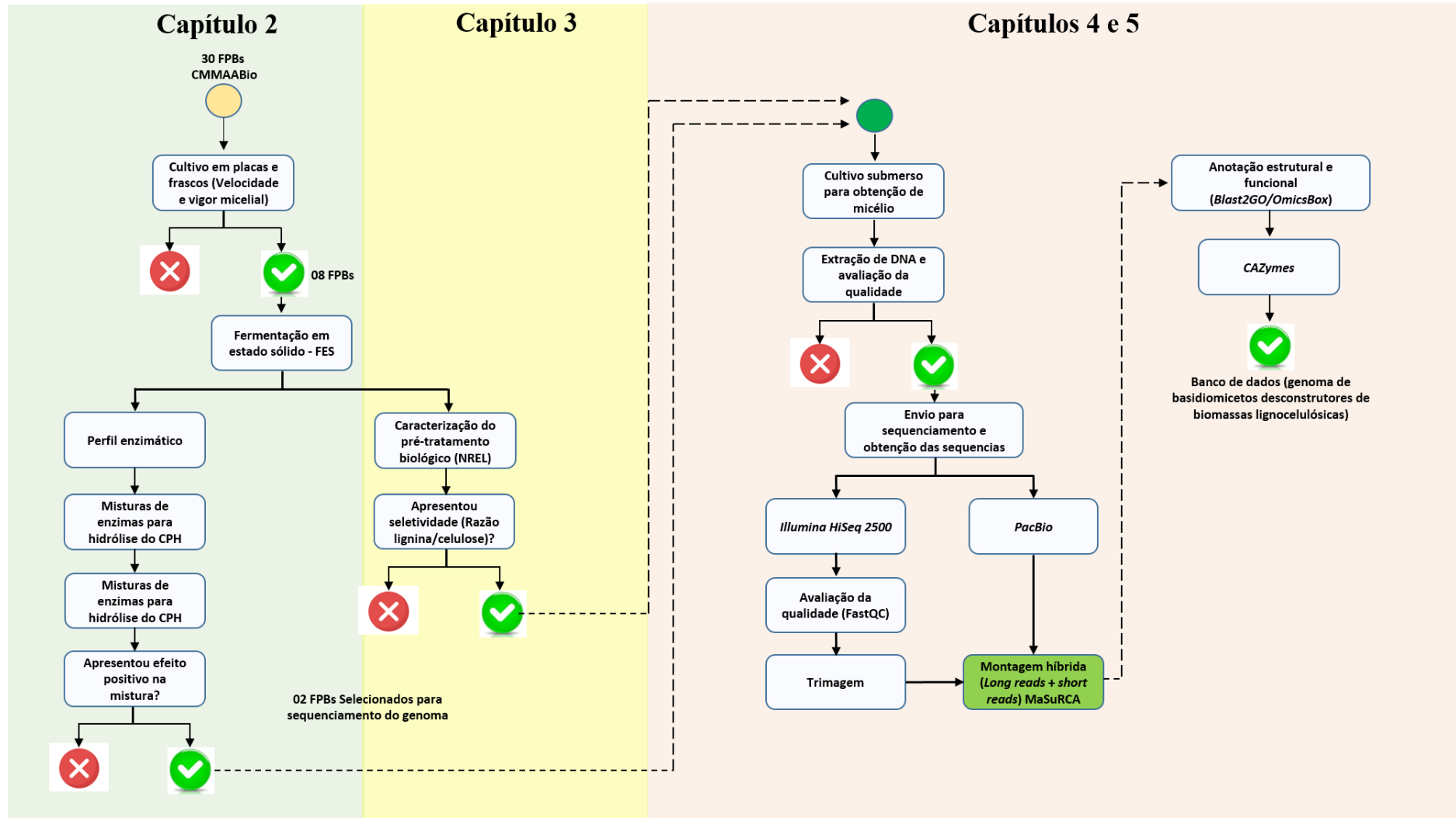
3.2 Específicos

- OE1: Avaliar o crescimento *in vitro* de 30 macro-basidiomicetos da coleção Agroenergia sobre a fibra do cacho vazio de dendê e borra do decantador.
- OE2: Avaliar as atividades enzimáticas (lacase, peroxidases, xilanase, FPase, protease e fitase) dos 08 fungos que apresentarem melhor crescimento nas biomassas do dendê *in vitro*.
- OE3: Verificar o efeito da combinação dos extratos enzimáticos dos 08 macro-basidiomicetos, com celulasas comerciais na liberação de açúcares do cacho pré-tratado por autohidrólise.
- OE4: Caracterizar a biomassa do cacho vazio de dendê, após o pré-tratamento com os 08 basidiomicetos para seleção daqueles que possuem habilidade seletiva de degradação.
- OE5: Realizar a identificação molecular das oito linhagens de macro-basidiomicetos.
- OE6: Realizar cultivos submersos para obtenção de micélio e extração de DNA dos dois melhores macro-basidiomicetos selecionados a partir da triagem.
- OE7: Avaliar a qualidade do DNA genômico obtido de dois macro-basidiomicetos selecionados
- OE8: Realizar o envio de amostras do DNA genômico para sequenciamento nas plataformas *Illumina HiSeq 2500* e *PacBio*.
- OE9: Realizar a montagem híbrida dos genomas dos dois macro-basidiomicetos selecionados, utilizando ferramentas de bioinformática.
- OE10: Realizar a anotação funcional e estrutural dos genomas dos dois fungos buscando identificar genes relacionados com enzimas lignocelulolíticas (Cazymes).

4 ESTRUTURA DA TESE

Para facilitar a compreensão, o trabalho foi dividido em capítulos, procurando responder aos objetivos propostos. No capítulo 2, ocorreram as etapas de cultivo em placas de petri e em frascos de vidro. As atividades enzimáticas foram mensuradas e os extratos utilizados para confecção de coquetéis / misturas. No capítulo 3, o cacho pré-tratado biologicamente com os macro-basidiomicetos, foi caracterizado para avaliar a seletividade sobre a lignina. Finalmente, nos capítulos 4 e 5 as duas linhagens de macro-basidiomiceto escolhidas, com base nos capítulos anteriores, tiveram o genoma sequenciado (*Illumina* e *PacBio*) e anotado (FIGURA 11).

Figura 11 – Fluxograma das etapas desenvolvidas (capítulos) no presente estudo.



Fonte: Do autor (2019).

**CAPÍTULO 2 – Seleção de macro-basidiomicetos para hidrólise enzimática do
cacho de dendê**

RESUMO

Economia de base biológica ou circular é uma nova tendência no contexto da bioeconomia, que é baseada no aproveitamento de resíduos como matéria-prima para a obtenção de subprodutos. Dentro desta perspectiva e alinhado às necessidades globais de redução da emissão de poluentes, o uso de biomassas lignocelulósicas oriundas da agroindústria do óleo de palma (*Elaeis* spp.), surge como uma oportunidade. Nesse sentido, o cacho vazio, representa uma fração considerável de polissacarídeos (celulose e hemicelulose), porém, é constituído por uma fração de lignina, polímero que confere recalcitrância a biomassa. Por isso, em plantas industriais no modelo de biorrefinarias de resíduos lignocelulósicos, uma das etapas que antecede a hidrólise enzimática, é o pré-tratamento de biomassas. Os pré-tratamentos comumente utilizados são químicos, físicos e/ou combinados em altas temperaturas, o que leva a formação de substâncias tóxicas que dificultam a ação de celulasas e ou reduz os rendimentos na fermentação dos açúcares. Neste contexto, alguns fungos de podridão branca ou macro-basidiomicetos, apresentam em seu arcabouço enzimático, enzimas especializadas em remover a fração lignolítica (lacases e peroxidases), gerando uma outra alternativa de pré-tratamento, sendo neste caso biológico, em função da desconstrução parcial da lignocelulose pelos fungos. Nesse sentido, foram avaliadas neste trabalho 30 linhagens de macro-basidiomicetos isolados do cerrado brasileiro e ou adquiridos em feiras (cogumelos comerciais), como agentes produtores de enzimas desconstrutoras de parede celular vegetal (pré-tratamento biológico). Os macro-basidiomicetos foram cultivados em placas de Petri e em sistema de fermentação estado sólido (FES) – utilizando cacho vazio de dendê (CVD) como fonte de carbono. O processo de hidrólise enzimática fez uso dos extratos brutos enzimáticos desses macro-basidiomicetos e combinações com celulasas comerciais e/ou extratos enzimáticos dos fungos “comerciais” produtores de celulasas *Trichoderma reesei* (ATCC60787) (Tr) e *Aspergillus aculeatus* (F-50 NBRC108796) (Aa). Em combinação com estes dois fungos, os melhores rendimentos de glicose ocorreram para [(Tr + Aa) + *Pleurotus* sp. – FPB 109] com $19,7 \pm 1,0\%$ seguido dos combos com *Fomes fasciatus* FPB-28 ($18,8 \pm 0,6\%$) e *Coprinus* sp. FPB-125 ($17,6 \pm 1,2\%$). Já na combinação de extratos enzimáticos de macro-basidiomicetos com as enzimas comerciais (Celluclast e Novozyme 188 Sigma®), os melhores rendimentos de glicose foram encontrados para *Flavodon flavus* ($14,78 \pm 0,6\%$) que ocorreu para a combinação [*Flavodon flavus* FPB-04 + (EC)] em comparação com o controle (EC) ($11,7 \pm 0,36\%$).

Palavras-chave: Pré-tratamento biológico. Macro-basidiomicetos. Biorrefinarias

ABSTRACT

Bio-based or circular economy is a new trend in the context of bioeconomy, which is based on the use of waste as a raw material to obtain by-products. Within this perspective and in line with the global needs for reducing the emission of pollutants, the use of lignocellulosic biomass from the palm oil agroindustry (*Elaeis* spp.) Appears as an opportunity. In this sense, the empty bunch represents a considerable fraction of polysaccharides (cellulose and hemicellulose), however, it is constituted by a fraction of lignin, a polymer that gives recalcitrance to biomass. Therefore, in industrial plants in the biorefinery model of lignocellulosic residues, one of the steps that precede the enzymatic hydrolysis, is the pretreatment of biomasses. The commonly used pre-treatments are chemical, physical and/or combined at high temperatures, which leads to the formation of toxic substances that hamper the action of celluloses and/or reduce yields in the fermentation of sugars. In this context, some fungi of white rot or macro-basidiomycetes, present in their enzymatic framework, enzymes specialized in removing the lignolytic fraction (laccases and peroxidases), generating another alternative of pretreatment, being in this biological case, as a function of deconstruction of lignocellulose by fungi. In this sense, 30 macro-basidiomycetes strains isolated from the Brazilian cerrado and purchased at fairs (commercial mushrooms) were evaluated as agents that produce deconstructive enzymes from the plant cell wall (biological pretreatment). The macro-basidiomycetes were cultivated in petri dishes and in a solid state fermentation system (SSF) - using empty fruit bunches (CVD) as carbon source substrate and obtaining carbohydrate monomers - enzymatic hydrolysis. The enzymatic hydrolysis process made use of crude enzymatic extracts of these macro-basidiomycetes and combinations with commercial cellulases and/or enzymatic extracts of *Trichoderma reesei* (ATCC60787) (Tr) and *Aspergillus aculeatus* (F-50 NBRC108796) (Aa). In combination with these two fungi, the best glucose yields occurred for [(Tr + Aa) + *Pleurotus* sp. FPB-109] with 19.7 ± 1.0 followed by combos with *Fomes fasciatus* FPB-28 ($18.8 \pm 0.6\%$) and *Coprinus* sp. FPB-125 ($17.6 \pm 1.2\%$). In the combination of enzymatic extracts of macro-basidiomycetes with commercial enzymes (*Celluclast* and *Novozyme-188* Sigma®), the best glucose yields were found for *Flavodon flavus* ($14.78 \pm 0.6\%$) that occurred for the combination [*Flavodon flavus* FPB-04 + (EC)] compared to control (EC) ($11.7 \pm 0.36\%$).

Keywords: Biological pretreatment. Macro-basidiomycetes. Biorefinery

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é uma matéria-prima potencial para geração de produtos de valor agregado como químicos e biocombustíveis, contudo, sua recalcitrância conferida principalmente pela lignina, é um dos fatores que limitam sua conversão em bioprodutos (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014). Em função disso, torna-se necessário o emprego de pré-tratamentos agressivos como alcalino, ácido e vapor em altas temperaturas para desconstruir a parede celular vegetal e posterior quebra dos polissacarídeos da holocelulose (celulose e hemicelulose) por ação enzimática, por exemplo.

Ainda há impasses a serem resolvidos quando o objetivo de tais combinações de processos (pré-tratamento e hidrólise enzimática) é obtenção de açúcares solúveis para fermentação em etanol (segunda geração) ou outros bioprodutos. Um dos problemas é a formação de inibidores, gerados durante o pré-tratamento e que comprometem o processo de fermentação (cultivo das leveduras) provocando redução nos rendimentos de etanol ou na produção de ácidos orgânicos (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

O pré-tratamento biológico utilizando principalmente os fungos de podridão branca (inglês, *White-rot fungi* - WRFs) e/ou combinados com tratamentos químicos ou físicos são alternativas para aumentar o rendimento das frações de hexose e pentoses da holocelulose (SHIRKAVAND et al., 2016; THOMSEN et al., 2016). Na natureza, os macro-basidiomicetos são os principais agentes de decomposição dos componentes da parede celular vegetal, justamente por possuírem arcabouço significativo de enzimas lignolíticas (SAHA et al., 2016). As principais enzimas extracelulares destes macro-basidiomicetos envolvidas na remoção da lignina, são a peroxidase de lignina (EC1.11.1.14), peroxidase de manganês (EC 1.11.1.13), lacase (EC 1.10.3.1) e peroxidases versáteis (EC 1.11.1.16) (THIRIBHUVANAMALA et al., 2017; WAN; LI, 2012).

O uso destes fungos como pré-tratamento de biomassas vegetais para posterior obtenção de bioprodutos apresentam algumas vantagens e características, como ambientalmente menos efluentes (ao contrário das lavagens nos pré-tratamentos químicos) e baixo custo (SALVACHÚA et al., 2013; TIAN; FANG; GUO, 2012). Apesar disso, existem algumas desvantagens como o tempo de colonização, podendo comprometer a eficiência. Entretanto, pode-se fazer a combinação do pré-tratamento

fúngico com tratamentos físicos ou químicos, para maximizar o rendimento de glicose e reduzir problemas com inibidores gerados pela quebra da lignina. A seletividade de alguns macro-basidiomicetos quanto a estrutura lignocelulósica é uma das principais vantagens deste processo. Uma vez que alguns destes fungos atacam seletivamente a lignina (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016; SAHA et al., 2017; SAHA et al., 2016; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

As biomassas vegetais residuais agroindustriais e os materiais lenhosos (madeiras) de modo geral, exibem diferenças em relação a estrutura e composição química, por isso, o comportamento de linhagens fúngicas pode ser diferente em cada tipo de material bem como a atuação de seus sistemas lignolíticos (ROUCHES et al., 2016; SHARMA; XU; QIN, 2017; SINDHU et al., 2016). Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar linhagens de macro-basidiomicetos da biodiversidade Cerrado brasileiro e/ou comerciais, afim de identificar cepas com alta capacidade lignolítica e pouca atividade holocelulolítica quando cultivados em cacho vazio de dendê, resíduo abundante na agroindústria de óleo de palma.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2 Linhagens de fungos macro-basidiomicetos

Foram utilizadas 30 linhagens de macro-basidiomicetos pertencentes a CMMAABio (Embrapa Agroenergia): FPB-03, FPB-04, FPB-11, FPB-21, FPB-22, FPB-26, FPB-28, FPB-36, FPB-37, FPB-102, FPB-104, FPB-109, FPB-114, FPB-115, FPB-116, FPB-117, FPB-118, FPB-119, FPB-121, FPB-122, FPB-124, FPB-125, FPB-126, FPB-127, FPB-128, FPB-129, FPB-131, FPB-132, FPB-133 e FPB-134.

Todas as linhagens foram mantidas em placas de petri contendo Batata dextrose ágar (BDA) em câmara fria a 4°C com repiques periódicos para manutenção.

2.3 Substratos lignocelulósicos

Os cachos de dendê e borra do decantador de óleo de dendê (*tridecanter*) foram cedidos pela empresa DENPASA (Dendê do Pará S/A). As amostras foram submetidas a secagem a 45°C por 3 dias e em seguida 60°C por 3 dias e moídas (80 mesh) (FIGURA 12). Posteriormente uma parte dos substratos foi triturada em moinho de facas tipo Willey Star FT-60 (peneira com granulometria $\cong 696 \mu\text{m}$) para preparo de meio de cultivo em meio ágar (placas Petri). O restante foi acondicionado em recipiente fechado e mantido em local seco e protegido da luz, para utilização nos cultivos axênicos (fermentação em estado sólido), pré-tratamento hidrotérmico e hidrólises enzimáticas.

Figura 12 – Resíduos lignocelulósicos da agroindústria do óleo de palma.



Legenda: (A) Fibras do cacho vazio e (B) Borra do decantador de óleo de dendê (*tridecanter*).

Fonte: Do autor (2019).

2.4 Cultivos: crescimento e vigor micelial

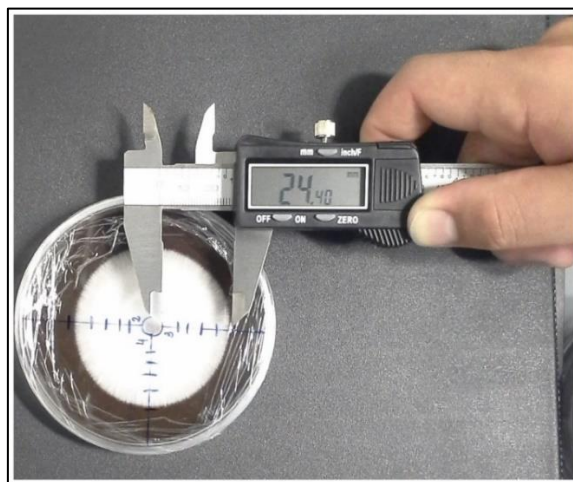
Cada fungo foi cultivado em placas de Petri (90x15 mm) contendo BDA por 10 dias, obtendo-se assim os inóculos (massa micelial).

2.4.1. Cultivo em placas: meio ágar enriquecido com substratos lignocelulósicos:

Foram preparados três meios de cultivo com ágar enriquecido: (1) com fibras do cacho de dendê (triturado) 10% m/v e ágar 1,5% m/v; (2) fibras do cacho de dendê 10% m/v, borra do decantador 10 % m/v e ágar 1,5% m/v; e, (3) meio batata dextrose ágar (BDA) (Sigma –Aldrich) (controle). Os meios de cultivos foram autoclavados a 121 °C, 1 atm durante 30 minutos e vertidos em placas de Petri.

A capacidade de crescimento e o vigor micelial foram mensurados nos cultivos em meio ágar enriquecidos. Um disco micelial de aproximadamente 7 mm foi utilizado como inóculo em cada meio avaliado em cultivo ágar (placas). Os fungos foram mantidos em câmara incubadora B.O.D. a 28 °C e o crescimento micelial foi avaliado a cada dois dias iniciando a partir do terceiro até o 11° dia, utilizando de paquímetro digital para medida do raio de crescimento micelial (cm) (FIGURA 13). O vigor micelial foi avaliado ao final dos 11 dias de cultivo, utilizando uma escala de 0 a 5 pontos. Onde: 0 = indica ausência de crescimento e vigor; e, 5 = excelente vigor (visual). Imagens estão apresentadas no Apêndice A (imagens obtidas após 11 dias de cultivo).

Figura 13 – Foto das avaliações de crescimento utilizando paquímetro digital.



Legenda: foram realizadas marcações na placa a fim de desconsiderar a porção do inóculo (círculo central) e os lados foram enumerados com o objetivo de evitar que um mesmo lado fosse medido mais de uma vez. Os traçados menores indicam o limite atingido pelo micélio no dia da avaliação. Fonte: Do autor (2019).

2.4.2 Cultivo em frascos de vidro: meio com substratos lignocelulósicos

Os macro-basidiomicetos que apresentaram maior raio e maior vigor micelial no cultivo em meio ágar enriquecido com substratos lignocelulósicos foram selecionados para o cultivo em frascos de vidro contendo somente biomassas residuais da agroindústria em fermentação estado sólido (FES).

As biomassas (CVD e BD) foram secas e trituradas (80 *mesh*). Os substratos lignocelulósicos foram dispostos em frascos de vidro (250 mL), constituindo dois meios de cultura FES: FES-1) 30 g de cacho de dendê; FES-2) 30g da mistura de cacho com borra na proporção 2:1 (m/m) (FIGURA 14). A umidade foi ajustada para aproximadamente 65% (± 5) com adição de água destilada, seguido de esterilização em autoclave por 30 minutos a 121 °C e 1 Atm. Os frascos contendo os macro-basidiomicetos no sistema FES foram incubados por 30 dias a 28°C em BOD (ventilada). Os fungos que apresentam capacidade de crescimento nos meios de cultura contendo somente o substrato cacho de dendê (FES-1) e em menos tempo, foram selecionados para avaliação quanto as atividades enzimáticas e potencial para aplicação em pré-tratamento deste tipo de substrato lignocelulósico.

Figura 14 – Frascos com substratos lignocelulósicos e fungos em crescimento.



Legenda: (A) Fibras de cacho vazio de dendê, (B) Mistura de fibras de cacho e borra do decantador e (C) Crescimento dos macro-basidiomicetos e marcações para medição do crescimento.

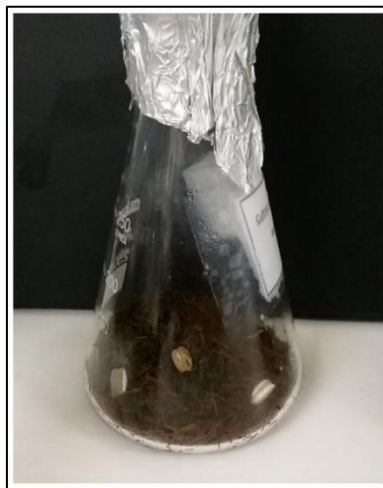
Fonte: Do autor (2019).

2.5 Avaliação da produção de enzimas lignocelulolíticas em cultivo FES por macro-basidiomicetos

Oito macro-basidiomicetos foram selecionados a partir dos resultados da capacidade de crescimento e vigor micelial observados nos cultivos em meio ágar

enriquecidos (placas) e FES (frascos). Os selecionados foram novamente cultivados no meio FES-1 com a seguinte modificação: empregou-se 10 g de fibra de cacho de dendê em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL por 21 dias, mantendo as demais condições de cultivo (FIGURA 15).

Figura 15 – Sistema de fermentação em estado sólido (FES-1 modificado).



Legenda: Em frasco *Erlenmeyer* de 250 mL com 10 g de fibras de CVD iniciado com três discos miceliais (7 mm) de macro-basidiomiceto.

Fonte: Do autor (2019)

2.5.1 Extratos brutos enzimáticos (EBE)

Atividades de algumas enzimas lignocelulolíticas (celulases, xilanases e ligninases), protease e fitase e concentração de proteínas solúveis foram determinadas em três tempos (6, 13 e 21 dias) para amostras obtidas do cultivo em triplicata de oito macro-basidiomicetos (FPB-04, FPB-26, FPB-28, FPB-109, FPB-115, FPB-116, FPB-125, FPB-132) na condição FES-1 (modificada).

Os extratos brutos enzimáticos (EBE) foram obtidos através de lavagem da biomassa colonizada com uma solução de Tritox X-100 (0,1%) na proporção de 10 mL de solução para cada 1g de biomassa colonizada em shaker sob agitação de 200 rpm a 5°C durante 40 minutos, em seguida, o extrato foi filtrado com gaze (algodão), centrifugado a 10000 rpm 4°C por 10 minutos e o sobrenadante recolhido em tubos tipo *Falcon* de 50 mL. Foi adicionada azida sódica (concentração final de 0,02%) ao EBE para evitar o crescimento de microrganismos contaminantes. Em seguida, os mesmos foram mantidos em geladeira a 4°C até as análises subsequentes.

2.5.1.1 Proteínas solúveis totais

Para determinar o teor de proteínas solúveis totais, empregou-se o método do ácido bicinonínico (BCA) (SMITH et al., 1985) de acordo com o protocolo do kit comercial Sigma-Aldrich®, onde uma alíquota de 25 µL de cada EBE (previamente diluídos) foram colocados em placas tipo ELISA. Em seguida, para cada poço, foram adicionados 200 µL do reagente de trabalho (RT) preparado com duas soluções A e B (50:1) e imediatamente as placas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Simultaneamente, uma curva padrão foi construída com diluições seriadas a partir de uma solução de 2 mg.mL⁻¹ de albumina de soro bovino (BSA). Após a incubação, foi realizada a leitura em leitor de microplacas (SpectraMax M2^e, Molecular Devices Co. EUA) a 562nm. As absorbâncias dos pontos da curva foram plotadas com a sua concentração em mg.mL⁻¹ correspondente, onde foi obtida a equação linear. A quantificação de proteínas de cada amostra foi obtida relacionando o seu valor da absorbância com a equação da curva. Todos ensaios foram realizados em triplicata.

Posteriormente, os valores foram convertidos em mg.g⁻¹ de substrato lignocelulósico levando em consideração o volume de solução de extração (Triton X-100 0,1%) e a quantidade de substrato utilizado no sistema FES-1.

2.5.1.2 Enzimas holocelulolíticas

Para a determinação da atividade de FPase utilizou-se o método miniaturizado proposto por Xiao e colaboradores (2004): Utilizando placas de PCR 96 poços adicionou-se discos de 7 mm de papel de filtro Whatman n° 1 (*GE Healthcare Life Sciences*; Piscataway, NJ. USA) juntamente com 40 µL de tampão citrato de sódio/Ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 e 20 µL do EBE. Em termociclador (*Applied Biosystems*®) a placa vedada foi incubada a 50 °C durante 1 hora; adicionou-se 120 µL de DNS (ácido 3,5-DinitroSalicílico), com posterior incubação por 10 min a 95 °C (MILLER, 1959); uma alíquota de 36 µL foi transferida para uma placa de Elisa previamente preparada com 160 µL de água deionizada e a leitura realizada a 540 nm.

Para a determinação das atividades de endoglicanase (CMCase) e xilanase foram realizados microensaios incubando-se 5 µL do EBE e 10 µL dos substratos (CMC – CarboxiMetilCelulose 2% ou xilana *beechwood* 2% - Sigma-Aldrich; St. Louis, MO. USA) e tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0, respectivamente por 30 min

a 50 °C (FERREIRA FILHO; PULS; COUGHLAN, 1993 com modificações). Ao término deste período, as reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de 30 µL de solução DNS e incubação a 95 °C por 10 min (MILLER, 1959). Em seguida, foram adicionados 150 µL de água destilada, sendo realizada a leitura da absorbância a 540 nm.

A atividade de β-glicosidase foi determinada em placa de PCR 96 poços onde foram adicionados 100 µL do EBE juntamente com 100 µL do substrato (Celobiose 15 mM - Sigma-Aldrich) e tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0; a placa foi vedada e incubada em termociclador a 50 °C durante 30 min. Ao programar o equipamento, adicionou-se uma etapa de aquecimento a 95 °C por 10 min para inativação da enzima (ADNEY; BAKER, 1996; GHOSE, 1987 modificado); a glicose liberada foi quantificada em placa de Elisa com a transferência de 2,5 µL do ensaio e 250 µL do reagente enzimático GOD-POD (Bioclin®), incubação a 37 °C por 10 min e leitura da absorbância a 505 nm.

Estas atividades enzimáticas foram expressas em UI.g⁻¹ de substrato lignocelulósico seco, sendo UI definido como a quantidade de açúcar redutor (µmol) liberado por minuto. As curvas padrões de calibração foram determinadas com soluções de D-glicose, e D-xilose, variando-se as concentrações de 0,2 a 10,0 mg.mL⁻¹ (CMCase e Xilanase), respectivamente, e, de 0,0 a 0,250 mg.mL⁻¹ de D-glicose para β-glicosidase. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os desvios padrões foram menores que 10 % da média.

2.5.1.3 Enzimas Ligninolíticas

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico – Sigma-Aldrich) (WOLFENDEN; WILLSON, 1982) com modificações. O ensaio realizado em placas de Elisa 96 poços, foi composto de 180 µL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 onde adicionou-se 180 µL de EBE; imediatamente antes da leitura em espectrofotômetro, adicionou-se 40 µL de solução de ABTS 5 mM e realizou-se a cinética da reação em 90 segundos a 25 °C; foram realizadas leituras de absorbância a 420 nm a cada 5 segundos de reação (ϵ ABTS = 36000).

Para determinar a atividade de peroxidases totais, o meio reacional em placas de Elisa 96 poços, consistiu em adição de 140 µL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 juntamente com 180 µL de EBE e 40 µL de H₂O₂ 2 mM (Sigma-Aldrich); antes da leitura

foram adicionados 40 μL de solução de ABTS 5 mM; foi realizada a cinética da reação em 90 segundos a 25 °C, realizando leituras de absorvância a 420 nm a cada 15 segundos de reação (HEINZKILL et al., 1998) modificado (ϵ ABTS = 36000).

A atividade de peroxidase de manganês foi determinada em placas de Elisa 96 poços com o meio reacional composto por 75 μL de solução reagente SR (100 μL de vermelho de fenol 0,1%, 100 μL de lactato de sódio 250 mM, 200 μL de albumina bovina 0,5%, 50 μL de MnSO_4 2 mM e 50 μL de H_2O_2 2 mM), 150 μL de tampão succinato de sódio 20 mM pH 4,5 e 75 μL de EBE; as placas foram incubadas a 30 °C durante 5 min e a reação foi interrompida com adição de 6 μL de NaOH 2 M; a absorvância foi determinada a 610 nm (ϵ vermelho de fenol = 44600).

Para determinar a atividade de peroxidase de lignina, adotou-se um método baseado na oxidação do corante *Azure B* (ARCHIBALD, 1992) adaptado. Em placas de 96 poços adicionou-se 156 μL de tampão citrato/fosfato 125 mM pH 3,0 juntamente com 156 μL de EBE, 8 μL de *Azure B* 1,6 mM; imediatamente antes da leitura adicionou-se 80 μL de H_2O_2 2 mM e a absorvância foi determinada a 651 nm.

Estas atividades enzimáticas foram expressas em UI.g^{-1} de substrato lignocelulósico seco, sendo UI definido como a unidade catalítica internacional que se refere à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de substrato por minuto. A atividade de peroxidases totais foi expressa subtraindo-se o valor de atividade obtido no ensaio do valor obtido para atividade de lacase. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5.1.4 Atividade de protease

O ensaio para determinar atividade de protease foi utilizando-se azocaseína como substrato da enzima. A mistura reacional foi preparada com 100 μL do EBE e 100 μL de azocaseína 0,5% (Sigma-Aldrich) em placas de PCR 96 poços; a incubação ocorreu em termociclador durante 40 min a 37°C; adicionou-se 100 μL de TCA 10% (Sigma-Aldrich) para parar a reação e a placa foi centrifugada a 4700 rpm durante 15 min; uma alíquota de 250 μL do sobrenadante foi recolhida e adicionada a 150 μL de KOH 0,5M previamente adicionado em placas de Elisa 96 poços; realizou-se a leitura a 430 nm em espectrofotômetro.

Esta atividade enzimática foi expressa em $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ de substrato lignocelulósico seco, sendo UI definido como a unidade catalítica internacional que se refere à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de azocaseína por minuto.

2.5.1.5 Atividade de fitase

Para determinar atividade de fitase utilizou-se o ácido fítico como substrato. Em tubos de ensaio adicionou-se a mistura reacional composta por 50 μL de ácido fítico 1% (Sigma-Aldrich) preparado em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5 e 50 μL de EBE; os tubos foram incubados em banho maria durante 30 min a 50°C; posteriormente foram adicionados 100 μL de TCA 15% para paralisar a reação e 300 μL de água destilada; em seguida, adicionou-se 900 μL do reagente cromogênico (RC) constituído por H_2SO_4 0,76 M, ácido ascórbico 10% e molibdato de amônio 2,5%, (3:1:0,5 v/v/v). Após 20 min a 50°C, foi realizada a leitura a 820 nm e os cálculos foram determinados a partir da equação da reta obtida pela curva padrão de Fosfato de Potássio 10 mM entre 10 e 100 $\mu\text{mol}/50$ μL (GULATI; CHADHA; SAINI, 2007; HARLAND; MORRIS, 1995; MITCHELL et al., 1997 com adaptações). Esta atividade enzimática foi expressa em $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ de substrato lignocelulósico seco, sendo que unidade de atividade enzimática (UI), foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um μmol de fosfato por minuto, nas condições de ensaio.

2.6 Combinação de EBE de macro-basidiomicetos com EBE de fungos ascomicetos e enzimas comerciais para hidrólise do cacho de dendê pré-tratado hidrotermicamente

A hidrólise do cacho pré-tratado hidrotermicamente (autohidrólise), foi avaliada por meio de misturas entre EBEs de macro-basidiomicetos e EBEs dos ascomicetos *Trichoderma reesei* (ATCC60787) e *Aspergillus aculeatus* (F-50 NBRC108796) pertencentes à “Coleção de microrganismos e microalgas aplicados a agroenergia e biorrefinarias” (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia ou EBE de Macro-basidiomicetos com as enzimas comerciais “*Cellulase*” de *Trichoderma reesei* (ATCC 26921) e “*Cellobiase*” de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich).

2.6.1 Pré-tratamento hidrotérmico do cacho vazio de dendê

A biomassa CVD foi submetida ao pré-tratamento hidrotérmico (autohidrólise) em reator de alta/baixa pressão (4520 - *Parr Instruments Company*, Moline, Illinois EUA). Utilizou-se 60 gramas de cacho triturado *in natura* e 710 mL de água da torneira; a mistura foi acondicionada no recipiente do reator, submetida ao processo de aquecimento a 180°C durante 40 minutos e agitação constante a 600 rpm; após resfriamento do sistema, o CVD foi submetido a uma filtração simples em gaze para remoção do liquor, em seguida, o agora denominado cacho pré-tratado hidrotérmicamente (CVD-AH), foi armazenado em recipiente fechado em refrigerador a 4°C. Foi realizada a determinação de massa seca do CVD-AH a fim de se obter o teor de sólidos. A biomassa não foi submetida a nenhum tratamento de lavagem.

2.6.2 Cultivo, obtenção de extratos brutos enzimáticos (EBE) e determinação do teor de proteínas solúveis e atividades de holocelulases de *T. reesei* e *A. aculeatus*

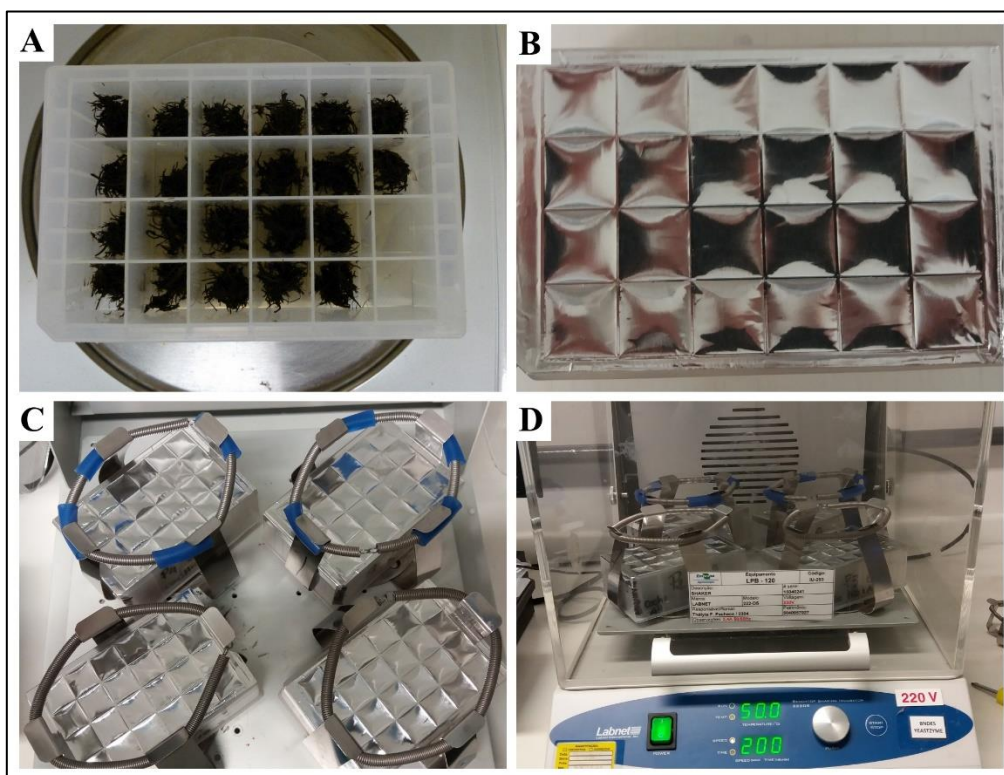
Os ascomicetos *T. reesei* (ATCC60787) e *A. aculeatus* (F-50 NBRC108796) foram cultivados em meio de cultura líquido (MANDELS; WEBER, 1969), suplementado com 2,5% de borra de dendê moída. Esta condição de cultivo favorece a produção de celulases por estes fungos conforme Peláez, (2017). Após preparo do meio de cultura, o mesmo foi autoclavado a 121°C 1 Atm durante 30 minutos. Seis discos miceliais de 7 mm de *T. reesei* e *A. aculeatus* cultivados em BDA por 7 dias, separadamente, foram utilizados como inóculo do cultivo líquido (fermentação submersa - FS), os frascos foram incubados por 7 dias em shaker a 28°C e 150 rpm. Foram recolhidas alíquotas de 1 mL do sobrenadante durante todos os dias para verificar o perfil enzimático e teor de proteínas solúveis. Decorrido o tempo de cultivo, os EBEs foram centrifugados a 4°C, 10000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, adicionou-se azida sódica (concentração final de 0,02%) e em seguida foram armazenados em refrigerador a 4°C. Foram realizadas 4 repetições para cada fungo.

2.6.3 Efeito da adição de EBE de macro-basidiomicetos em combinação com extrato celulolítico ou enzimas comerciais na hidrólise do CVD-AH

Para montagem das hidrólises enzimáticas (HE) utilizou-se placas de 24 poços tipo *deep well*, onde foram pesados 0,45g de CVD-AH por poço (correspondendo a uma carga de sólidos de 5% com base na matéria seca), juntamente com um volume final de cerca de 2,2 mL em ambiente tamponado (citrato de sódio/ácido cítrico, 100 mM, pH 5,0) (FIGURA 16 A). A hidrólise foi realizada com duas diferentes misturas enzimáticas, onde: (C1) EBEs de Macro-basidiomicetos (12,69 mL.g⁻¹ substrato) e EBEs dos ascomicetos *T. reesei* (ATCC60787) e *A. aculeatus* (F-50 NBRC108796), nas dosagens de proteínas total de (0,65% de 12,5 mg.g⁻¹) e (0,35% de 12,5 mg.g⁻¹), respectivamente. C2) EBEs de macro-basidiomicetos (12,69 mL.g⁻¹) com as enzimas comerciais *Cellulase* de *T. reesei* (ATCC 26921) (Celluclast®) (Sigma-Aldrich®) e *Cellobiase* de *A. niger* (Novozyme-188®) (Sigma-Aldrich®) com a seguinte dosagem de proteínas: (0,65% de 12,5 mg.g⁻¹) e (0,35% de 12,5 mg.g⁻¹), respectivamente.

As placas foram seladas com filme adesivo e transferidas para shaker ambientado a 50°C, a agitação foi de 200 rpm durante 24 horas (FIGURA 16 B-D); foram recolhidas alíquotas nos tempos 0 e 24 horas em tubos tipo *epENDORF* de 1,5 mL e após centrifugados a 10000 rpm, 4°C durante 10 minutos, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -20°C para determinação de glicose e xilose em cromatógrafo líquido de alta eficiência (inglês, HPLC).

Figura 16 – Montagem das hidrólises enzimáticas (HE).



Legenda: (A) cacho pré-tratado hidrotérmicamente (autohidrólise) aferindo a massa nas células da placa *Deep well*; (B) placa selada com filme adesivo; (C) placas organizadas em “garras de 1L” em shaker de bancada; (D) Placas em agitação a 200 rpm e 50 °C.

Fonte: Do autor (2019).

2.7 Efeito da concentração de EBE de macro-basidiomicetos nas misturas com EBE de ascomicetos ou enzimas comerciais

Com base nos resultados obtidos anteriormente, os fungos FPB 04 e FPB 28 foram selecionados a fim de se verificar o efeito da concentração de seus extratos, em combinação com extratos celulolíticos, sobre a hidrólise do CVD-AH. Uma alíquota de 150 mL de EBE de cada macro-basidiomiceto foi liofilizada e ressuspensos em 30 mL de água destilada concentrando-os, então, em 5 vezes. Os mesmos ficaram armazenados em geladeira a 4°C até a utilização e passou a ser denominado extrato bruto enzimático concentrado (EBEc). Os EBEs obtidos dos ascomicetos *T. reesei* e *A. aculeatus* foram mantidos sem concentrar para compor os coquetéis. Foram preparadas misturas de EBEC (12,69 mL.g⁻¹) (em 3 concentrações e sem concentrar) de macro-basidiomicetos juntamente com EBE de ascomicetos e/ou com as enzimas comerciais *Celluclast*[®] e *Novozyme-188*[®] (Sigma-Aldrich) nas concentrações utilizadas anteriormente.

As concentrações de EBE de macro-basidiomicetos testadas foram:

EBE-A: EBE concentrado 5X (EBEc);

EBE-B: EBE concentrado 2,5X;

EBE-C: EBEC diluído 5 vezes;

EBE-D: Extrato sem concentrar (EBE);

Assim como nas outras hidrólises, os açúcares (glicose e xilose) foram quantificados via HPLC.

2.8 Quantificação de glicose e xilose por HPLC e determinação do rendimento de glicose e xilose

Para determinação dos teores de glicose e xilose nos hidrolisados obtidos, as amostras previamente diluídas, foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (inglês, HPLC) (*Agilent Technologies*), com as seguintes condições cromatográficas: Coluna Aminex® HPX-87H (300 x 7,8 mm, *Bio-Rad*); como fase móvel foi utilizada uma solução de H₂SO₄ 5 mM; a temperatura da coluna foi de 45°C, tempo de corrida de 12 minutos e vazão da fase móvel 0,6 mL.min⁻¹. A concentração dos açúcares foi determinada por meio de equação linear gerada por uma curva de calibração com pontos correspondentes a diluições seriadas de uma solução de glicose e xilose de 5 mg.mL⁻¹.

Os rendimentos das hidrólises realizadas foram determinados em comparação com máximo teórico (WANG, Y. et al., 2018):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Glicose liberada na hidrólise} \times 0,9}{\text{Teor de glucana no material}} \times 100 \quad (1)$$

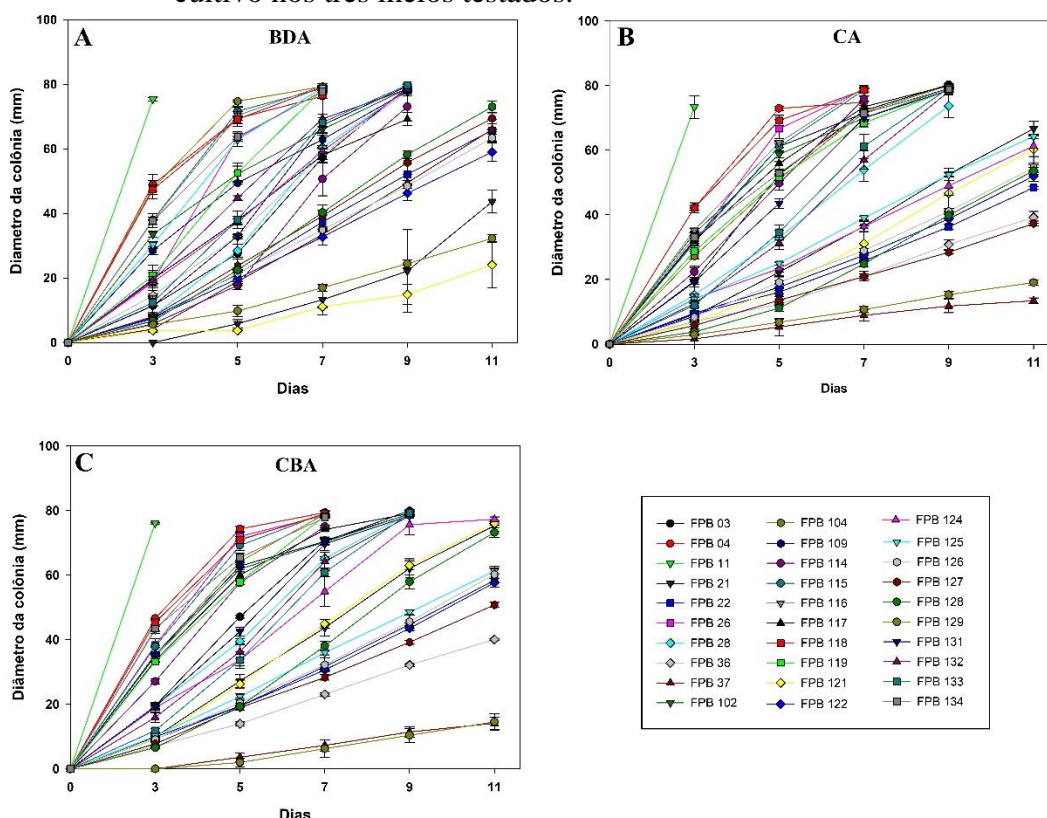
$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Xilose liberada na hidrólise} \times 0,88}{\text{Teor de xilana no material}} \times 100 \quad (2)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento e vigor micelial em meio ágar enriquecido

O crescimento micelial de cada um dos macro-basidiomicetos em meios de cultura contendo ágar enriquecidos, foram observados por meio do diâmetro da colônia a cada dois dias do cultivo, partindo-se do terceiro dia até o décimo primeiro dia (11^o) (FIGURA 17). O FPB-11, por exemplo, apresentou crescimento acelerado (FIGURA 17 A, B, C), atingindo o diâmetro máximo em 3 dias, porém, com baixo vigor micelial quando comparado com *Flavodon flavus* FPB-04 e *Trametes* sp. FPB-134 que colonizaram toda a placa com meios ágar após sete dias (FIGURA 18) e (APÊNDICE A).

Figura 17 – Diâmetro das colônias (mm) de macro-basidiomicetos durante 11 dias de cultivo nos três meios testados.



Legenda: (A) Batata dextrose ágar (BDA); (B) cacho vazio de dendê + ágar (CA); (C) Cacho + borra do dendê + ágar (CBA). Os valores apresentados são a média e o desvio padrão de experimentos realizados em triplicata para cada linhagem. O crescimento máximo possível na placa foi de 80 mm.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 18 – Mapa de calor (cores) indicando o vigor micelial durante o crescimento dos macro-basidiomicetos em três meios (água enriquecido) com fontes de carbono distintas.

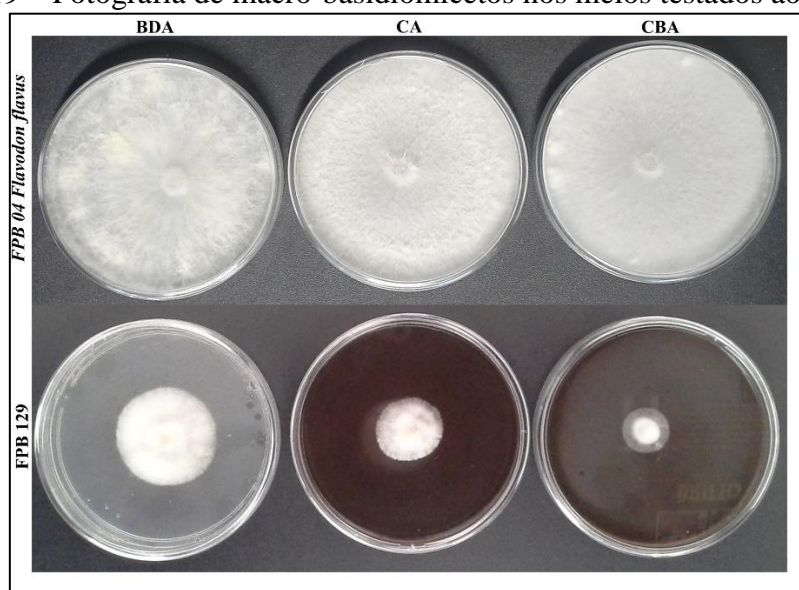
Linagem	BDA	CA	CBA	
FPB 04 - <i>Flavodon flavus</i>				0
FPB 26 - Nd				1
FPB 104 - Nd				2
FPB 115 - <i>Trametes</i> sp.				3
FPB 116 - <i>Pycnoporus</i> sp.				4
FPB 131 - <i>Pleurotus</i> sp.				5
FPB 132 - <i>Pleurotus</i> sp.				
FPB 133 - <i>Pleurotus</i> sp.				
FPB 134 - <i>Trametes</i> sp.				
FPB 28 - <i>Fomes fasciatus</i>				
FPB 123 - Nd				
FPB 114 - <i>Fomes</i> sp.				
FPB 21 - Nd				
FPB 121 - Nd				
FPB 119 - Nd				
FPB 118 - <i>Ceriporia</i> sp.				
FPB 125 - <i>Hormographiella</i> sp.				
FPB 117 - Nd				
FPB 126 - <i>Hypsizygus</i> sp.				
FPB 03 - <i>Ganoderma</i> sp.				
FPB 22 - <i>Hypsizygus</i> sp.				
FPB 122 - <i>Hypsizygus</i> sp.				
FPB 36 - Nd				
FPB 128 - Nd				
FPB 127 - <i>Hypsizygus</i> sp.				
FPB 109 - <i>Pleurotus</i> sp.				
FPB 11 - Nd				
FPB 37 - Nd				
FPB 102 - Nd				
FPB 129 - Nd				

Legenda: O vermelho (5) indica maior vigor micelial (visual) e a cor verde menor vigor micelial (visual). Meios de cultura: batata dextrose ágar (**BDA**); cacho de dendê + ágar (**CA**) e cacho de dendê + borra do decantador + ágar (**CBA**).

Fonte: Do autor (2019).

O vigor micelial dos macro-basidiomicetos *Flavodon flavus* FPB-04, FPB-26 (nd), FPB 104 (nd), *Trametes* sp. FPB-115, *Pycnoporus* sp. FPB-116, *Pleurotus* sp. FPB-131, *Pleurotus* sp. FPB-132 e *Pleurotus* sp. FPB-133 foi máximo em todos meios testados (FIGURA 18). Este vigor indica que houve uma relação carbono/nitrogênio e micronutrientes suficientes e disponíveis para realização do metabolismo microbiano. Em comparação com os demais, FPB 129 (nd) apresentou o pior desempenho nos meios testados (FIGURA 19).

Figura 19 – Fotografia de macro-basidiomicetos nos meios testados aos 11 dias.



Legenda: Meios de cultura: batata dextrose ágar (**BDA**); cacho de dendê + ágar (**CA**) e cacho de dendê + borra do decantador + ágar (**CBA**).

Fonte: Do autor (2019).

Os macro-basidiomicetos naturalmente apresentam habilidade de quebrar materiais lignocelulósicos na natureza, mas seu comportamento pode variar a depender da composição dos substratos onde estão se desenvolvendo, principalmente em função do arcabouço enzimas lignocelulolíticas de cada espécie (KAVANAGH, 2017).

Os gêneros *Flavodon* e *Pleurotus* têm sido relatados como excelentes desconstrutores de parede celular vegetal (KASSON et al., 2016; LEE et al., 2007). A presença das biomassas vegetais (dendê) no enriquecimento dos meios com ágar permitiu o crescimento e vigor de tais fungos, isso demonstra que são capazes de utilizar materiais lignocelulósicos pra obtenção de energia. Também apresentaram comportamento similar quando crescidos em meio com ágar contendo fontes de carbono e nitrogênio mais “disponíveis” (BDA).

Outros exemplos de gêneros de macro-basidiomicetos que apresentaram crescimento rápido e vigoroso nos meios testados foram o FPB-115 (*Trametes* sp.) e FPB-

116 (*Pycnoporus* sp.). Estes gêneros apresentam espécies que foram reportadas como produtoras de enzimas lignolíticas, tais como lacases (FILLAT et al., 2017). As fontes de carbono, temperatura, umidade, oxigenação são fatores preponderantes para o crescimento micelial e/ou frutificação de macro-basidiomicetos (HOA; WANG, 2015).

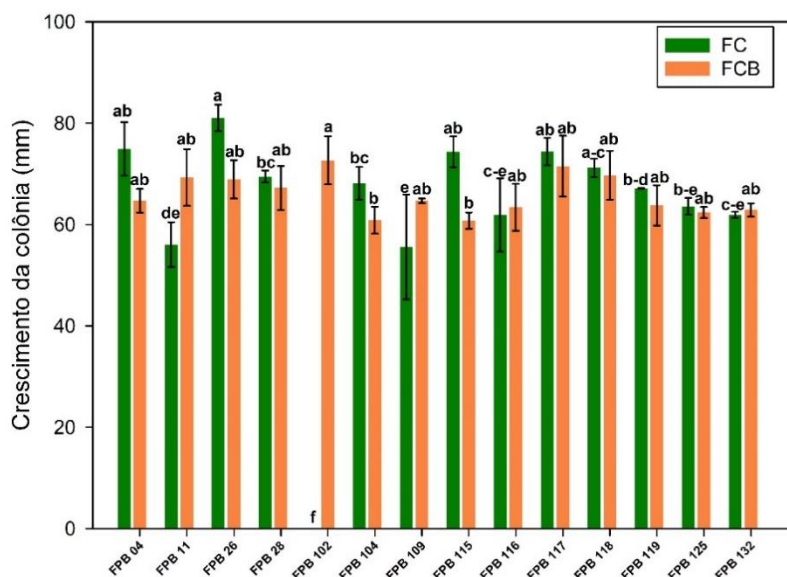
Hypsizygus sp., por exemplo, quando fora cultivado em substratos a base da forrageira *Panicum virgatum*, demonstrou melhor crescimento levando à produção de metabólitos nos meios com maiores teores de celulose (LIU et al., 2015).

Os fungos apresentam necessidades nutricionais bem simples, podem utilizar fontes de carbono como glicose a polissacarídeos como amido e celulose. Os macro-basidiomicetos podem ainda, utilizar compostos aromáticos como a lignina (WALKER; WHITE, 2017).

3.2 Crescimento dos macro-basidiomicetos cultivados em sistema FES com substratos lignocelulósicos

Os fungos que apresentaram melhor crescimento e vigor micelial em ágar contendo CVD e BD, também apresentaram bom crescimento quando realizados cultivos axênicos com cacho (FC-FES-1) ou mistura de cacho e borra (FCB-FES-2). Após 15 dias de cultivo nas condições testadas, os fungos com maior crescimento linear no FES-1 foram: FPB-26 (81,02 mm), *Flavodon flavus* FPB-04 (74,93 mm), FPB-117 (74,40 mm) e *Trametes* sp. FPB-115 (74,33 mm). O fungo FPB 102 não apresentou crescimento no sistema FES-1 (FIGURA 20).

Figura 20 – Crescimento de macro-basidiomicetos 15 dias após a inoculação em frascos com cacho de dendê FES-1

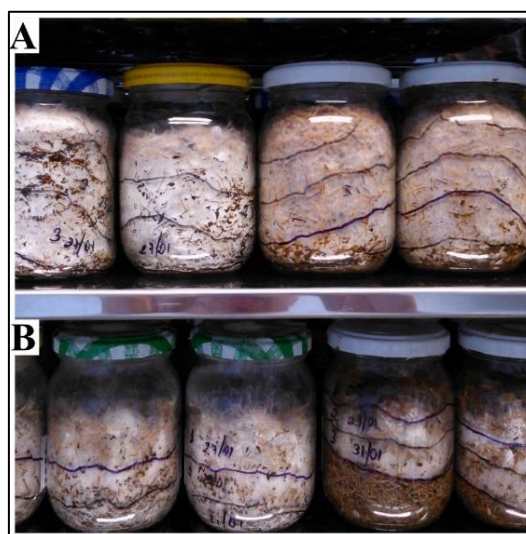


Legenda: cacho vazio de dendê FES-1 (FC) e em mistura de cacho e borra FES-2 (FCB). O crescimento máximo possível no frasco foi de 82mm. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os fungos em cada sistema de fermentação em estado sólido testado com base no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

A FES possibilitou uma segunda triagem dos macro-basidiomicetos quanto a capacidade de crescimentos em biomassas lignocelulósicas residuais do dendê. Aqueles que apresentaram bom crescimento e vigor nos cultivos em ágar enriquecido, também colonizaram bem as biomassas nos frascos de vidro (FIGURA 21).

Figura 21 – Crescimento dos macro-basidiomicetos nos sistemas de fermentação em estado sólido.



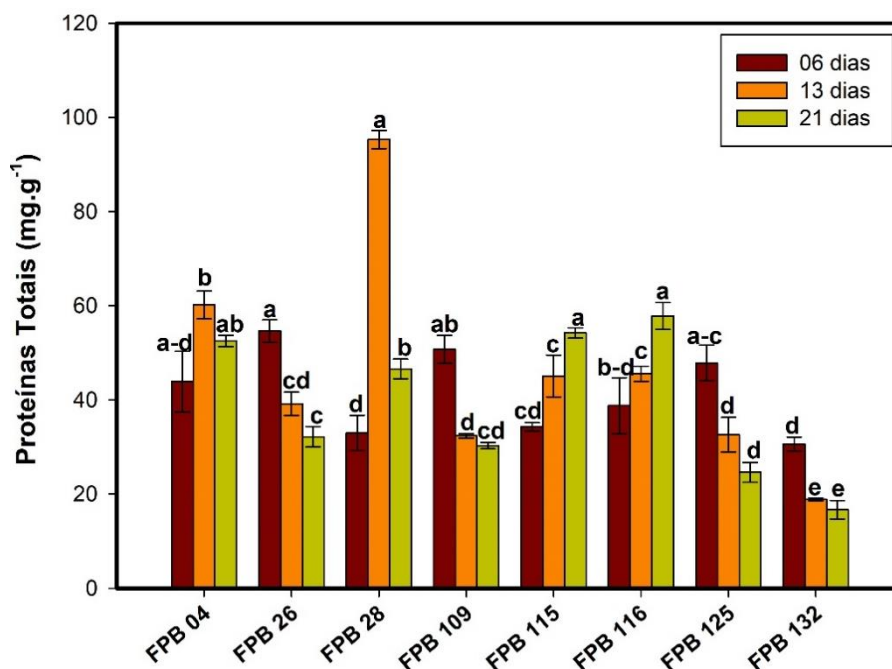
Legenda: FES-1 (A) e FES-2 (B).

Fonte: Do autor (2019).

3.3 Proteínas solúveis totais dos macro-basidiomicetos

Para avaliar o teor de proteínas solúveis totais, foram preparados EBEs como descrito no item 2.6.1 a partir do sistema FES-1 modificado (item 2.6). Aos seis dias de cultivo (FES) os EBEs que apresentaram os maiores teores de proteínas solúveis totais foram o FPB-26 e *Pleurotus* sp. FPB-109 com (54,67 mg.g⁻¹) e (50,76 mg.g⁻¹), respectivamente. Decorridos 13 dias *Fomes fasciatus* FPB-28 apresentou o maior teor (95,31 mg.g⁻¹) seguido por *Flavodon flavus* FPB-04 (60,17 mg.g⁻¹) e aos 21 dias, *Pycnoporus* sp. FPB-116 e *Trametes* sp. FPB-115 apresentaram os maiores teores (57,84 mg.g⁻¹) e (54,23 mg.g⁻¹), respectivamente, em relação aos demais fungos (FIGURA 22).

Figura 22 – Teores de proteínas solúveis totais dos EBEs dos macro-basidiomicetos cultivados em cacho de dendê (Sistema FES-1 modificado).



Legenda: Cultivo a 28°C e 65% (± 5) de umidade em três tempos de coleta. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os EBEs dentro de cada tempo de cultivo com base no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

O cacho vazio de dendê utilizado como substrato apresenta um teor de proteínas solúveis de 2,08% \pm 0,12 em base seca, além disso, o aumento do teor proteico em cultivos de macro-basidiomicetos pode ocorrer em função do crescimento micelial em sistema FES e conseqüentemente, secreção de várias enzimas (NARAIAN; SINGH, 2016). Por isso, a biomassa colonizada por fungos (FES) passa a ser uma fonte

interessante para obtenção de proteínas solúveis, mais especificamente, enzimas desconstrutoras de parede celular vegetal secretadas durante o metabolismo fúngico.

Após o cultivo de cogumelos comestíveis (macro-basidiomicetos) muitas vezes a biomassa residual pós-colheita dos cogumelos (inglês, *Spent Mushroom Substrate* – SMS) é descartado. Porém, trata-se de um produto de valor agregado por conter enzimas fúngicas além de ser enriquecido com outras proteínas, aminoácidos e substâncias químicas bioativas (HIYAMA; GISUSI; HARADA, 2011).

3.4 Enzimas ligninolíticas – macro-basidiomicetos

O perfil de enzimas ligninolíticas nos extratos foi determinado e os resultados obtidos em 3 tempos de cultivo podem ser verificados na Figura 23.

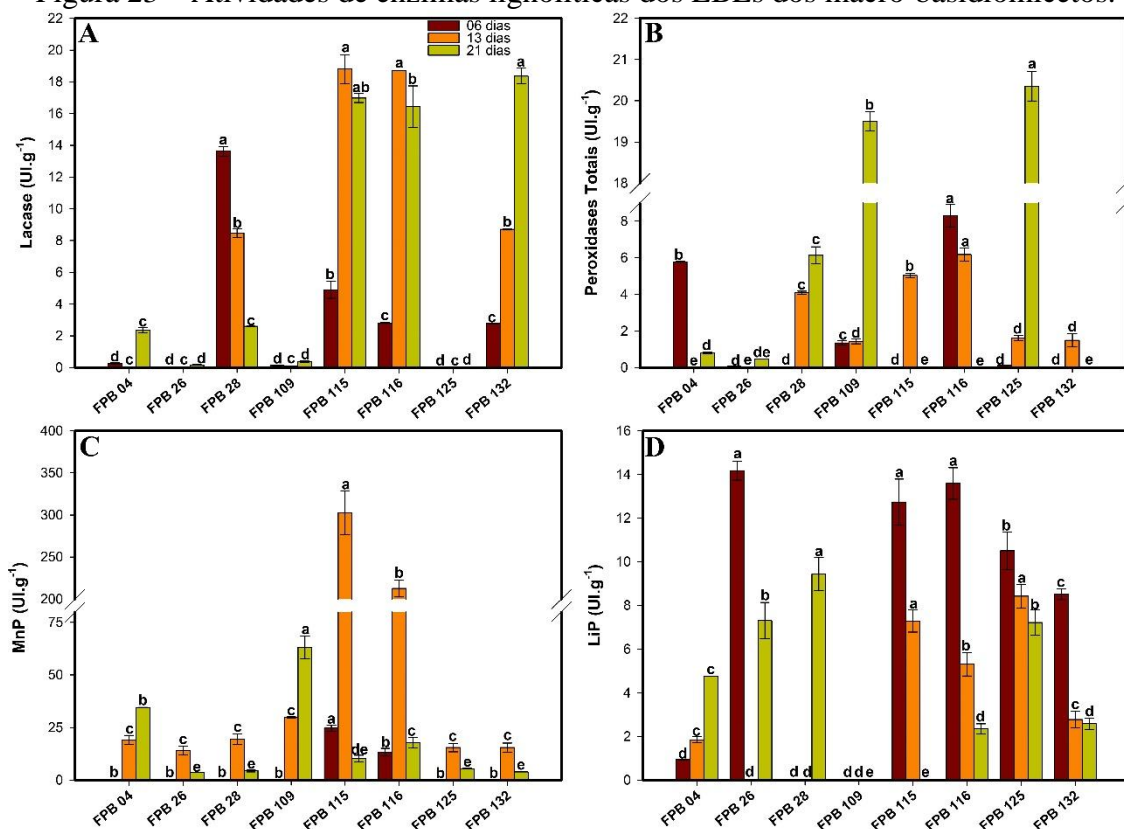
A maior atividade de lacase foi observada no cultivo de *Fomes fasciatus* FPB-28 aos 6 dias ($13,6 \pm 0,3$ UI.g⁻¹), seguido por *Trametes* sp. FPB-115 ($4,89 \pm 0,5$ UI.g⁻¹), *Pycnoporus* sp. FPB-116 ($2,8 \pm 0,02$ UI.g⁻¹) e *Pleurotus* sp. FPB-132 ($2,7 \pm 0,01$ UI.g⁻¹). Aos 13 dias, as maiores atividades foram observadas no cultivo de *Trametes* FPB-115 ($18,8 \pm 0,9$ UI.g⁻¹) e *Pycnoporus* sp. FPB-116 ($18,7 \pm 0,009$ UI.g⁻¹) e depois por *Pleurotus* sp. FPB-132 ($8,7 \pm 0,04$ UI.g⁻¹) e *Fomes fasciatus* FPB-28 ($8,4 \pm 0,2$ UI.g⁻¹). Já aos 21 dias, as maiores atividades ocorreram para *Pleurotus* sp. FPB-132 ($18,3 \pm 0,4$ UI.g⁻¹), *Trametes* sp. FPB-115 ($16,9 \pm 0,2$ UI.g⁻¹) e *Pycnoporus* sp. FPB-116 ($16,4 \pm 1,3$ UI.g⁻¹) (FIGURA 23 A).

Em relação a atividade de peroxidases totais, aos 6 dias a maior atividade foi verificada para *Pycnoporus* sp. FPB-116 ($8,2 \pm 0,6$ UI.g⁻¹) seguido por *Flavodon flavus* FPB-04 ($5,7 \pm 0,02$ UI.g⁻¹) e *Pleurotus* sp. FPB-109 ($1,3 \pm 0,1$ UI.g⁻¹). Nos 13 dias de cultivo, a maior atividade foi verificada *Pycnoporus* sp. FPB-116 ($6,1 \pm 0,3$ UI.g⁻¹) e depois por *Trametes* sp. FPB-115 ($5,0 \pm 0,1$ UI.g⁻¹) e *Fomes fasciatus* FPB-28 ($4,0 \pm 0,07$ UI.g⁻¹). Por fim, aos 21 dias o maior valor observado no cultivo de *Coprinus* sp. FPB - 125 ($20,3 \pm 0,3$ UI.g⁻¹) e *Pleurotus* sp. FPB-109 ($19,5 \pm 0,2$ UI.g⁻¹) (FIGURA 23 B).

O ensaio de peroxidase de manganês (MnP) aos 6 dias de cultivo, evidenciou maior atividade para *Trametes* sp. FPB-115 ($2,4 \pm 0,1$ UI.g⁻¹). A maior atividade aos 13 dias ($30,2 \pm 2,6$ UI.g⁻¹) ocorreu para *Trametes* sp. FPB-115 e depois para *Pycnoporus* sp. FPB -116 ($21,2 \pm 1,0$ UI.g⁻¹). Aos 21 dias a maior atividade ($6,3 \pm 0,5$ UI.g⁻¹) foi verificada para *Pleurotus* sp. FPB-109 seguido de *Flavodon flavus* FPB-04 ($3,4 \pm 0,006$ UI.g⁻¹) (FIGURA 23 C).

As maiores atividades de peroxidase de lignina (LiP) aos 6 dias, foram observadas para FPB-26 ($14,1 \pm 0,4 \text{ UI.g}^{-1}$), *Pycnoporus* sp. FPB-116 ($13,5 \pm 0,7 \text{ UI.g}^{-1}$) e *Trametes* sp. FPB-115 ($12,7 \pm 1,0 \text{ UI.g}^{-1}$). Aos 13 dias a maior atividade foi encontrada para *Coprinus* sp. FPB-125 ($8,4 \pm 0,5 \text{ UI.g}^{-1}$) seguido por *Trametes* sp. FPB-115 ($7,2 \pm 0,5 \text{ UI.g}^{-1}$) e *Pycnoporus* sp. FPB-116 ($5,3 \pm 0,5 \text{ UI.g}^{-1}$). Aos 21 dias de cultivo a maior atividade ocorreu para *Fomes fasciatus* FPB-28 ($9,4 \pm 0,7 \text{ UI.g}^{-1}$) depois em FPB-26 (nd) ($7,3 \pm 0,8 \text{ UI.g}^{-1}$) e *Coprinus* sp. FPB-125 ($7,2 \pm 0,5 \text{ UI.g}^{-1}$) (FIGURA 23 D).

Figura 23 – Atividades de enzimas lignolíticas dos EBEs dos macro-basidiomicetos.



Legenda: Lacase (A); peroxidases totais (B); peroxidase de lignina - LiP (C) e peroxidase de manganês - MnP (D) nos EBEs dos macro-basidiomicetos cultivados em CVD (Sistema FES-1 modificado) a 28°C e $65\% (\pm 5)$ de umidade em três tempos de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os EBEs dentro de cada tempo de coleta com base no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

O processo de degradação biótica de biomassas lignocelulósicas na natureza é dinâmico e influenciado por três fatores: bioquímico, de organismo e comunidade. No bioquímico é levada em consideração a estrutura da fibra vegetal e características enzimológicas. Em relação ao organismo, considera-se a cinética do crescimento e a expressão enzimática que é influenciada por fatores ambientais (regulação transcricional).

E no nível de comunidade, o metabolismo de cada organismo, estrutura, competição, sucessão e diversidade. Além disso, somado às características da biomassa, os padrões de respiração do organismo devem ser levados em consideração (SINSABAUGH; CARREIRO; ALVAREZ, 2002).

No presente estudo, como já esperado e observado na literatura, as atividades lignolíticas oscilaram de acordo com tempo de amostragem e a espécie de macro-basidiomiceto utilizada. López-Abelairas e colaboradores (2013) observaram durante o pré-tratamento biológico da palha de trigo em condições otimizadas, que as melhores atividades de lacase (3 UI.g^{-1}) e peroxidase de manganês ($2,5 \text{ UI.g}^{-1}$), foram encontradas aos 21 dias no cultivo de *Pleurotus eryngii*, enquanto que atividades inferiores foram observadas aos 3 e 5 dias para *Irpex lacteus*. No estudo realizado por Inácio et al., (2015) a atividade da lacase de *Pleurotus pulmonarius* foi a melhor nos tempos amostral 12º e 20º dia de cultivo em resíduos de laranja, com $12,2 \pm 0,15 \text{ UI.mL}^{-1}$ no 20º dia.

Foi demonstrado em *Trametes velutina* 5930 que a transcrição do gene da lacase pode ser induzida por íons metálicos como Cu^{2+} e Fe^{2+} além de compostos aromáticos estruturalmente relacionados a lignina (ácido cinâmico, ácido siringico ácido tânico, ácido gálico e guaiacol) (YANG et al., 2013). Além disso, alterações nas condições de cultivo como pH, temperatura, tempo de incubação, relação carbono / nitrogênio e adição de mediadores (MnSO_4 , oxalato, ABTS, álcool veratrílico e H_2O_2), influenciam diretamente na produção das enzimas lacase, peroxidase de manganês e peroxidase de lignina, como foi demonstrado para *S. commune* IBL-06 cultivado em palha de arroz (ASGHER et al., 2016).

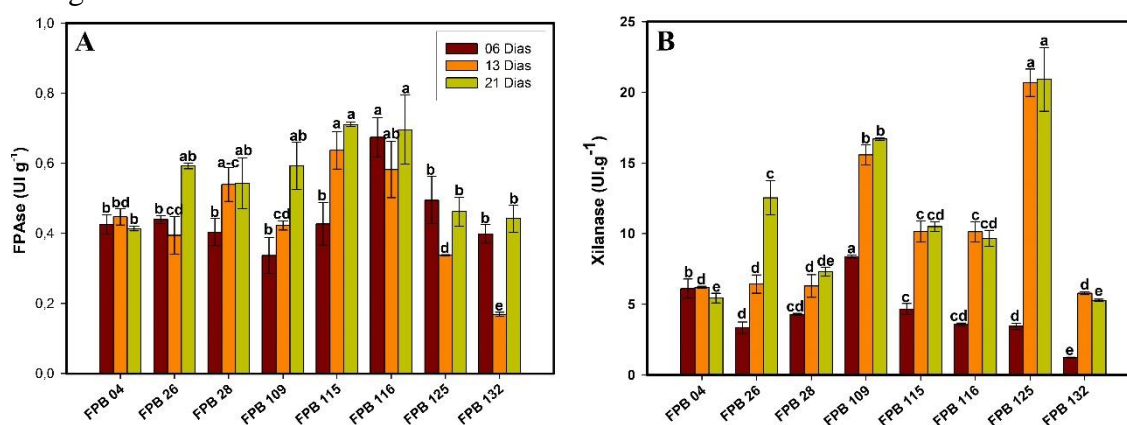
Enzimas desconstrutoras de lignina e compostos fenólicos são amplamente usadas e estudadas em processos de tratamento de efluentes e solos contaminados, como também na clarificação de bebidas, modificação da estrutura da madeira e melhoria da hidrólise (sacarificação) de materiais lignocelulósicos, compondo coquetéis enzimáticos em conjunto com celulases e hemicelulases de outros fungos de gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* entre outros (GASSARA-CHATTI et al., 2013; MOILANEN et al., 2015).

3.5 Enzimas celulolíticas – macro-basidiomicetos

Os resultados das atividades de FPAse e Xilanase no EBE obtido do cultivo dos macro-basidiomicetos em CVD (FES) também foram avaliadas (FIGURA 24).

De modo geral as atividades para celulases totais podem ser consideradas basais (FIGURA 24 A), uma vez que os macro-basidiomicetos não utilizam fontes primárias para obtenção deste grupo de enzimas, além disso, há uma interdependência e sobreposição significativa entre as enzimas lignolíticas e hidrolíticas e os mecanismos que as regulam (ELISASHVILI et al., 2011).

Figura 24 – Perfil de enzimas holocelulolíticas nos EBEs dos macro-basidiomicetos



Legenda: FPase (A) e Xilanase (B) nos EBEs dos macro-basidiomicetos cultivados em CVD (Sistema FES-1 modificado) a 28°C e 65% (± 5) de umidade em três tempos de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os EBEs dentro de cada tempo de coleta com base no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

Apesar disso, são excelentes produtores de outras famílias de enzimas pois possuem muitos genes que as codificam. Entre elas, as enzimas acessórias (família AA) que atuam na degradação de celulose e hemicelulose como a LPMO (*Litic Polissachairide Monoxigenase*) e proteínas do tipo expansina, por exemplo (ZHU et al., 2016).

A maioria das celulases investigadas para aplicações industriais pertencem a fungos filamentosos dos gêneros *Thichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola* entre outros (KUHAD et al., 2016). Além disso, em comparação com as enzimas modificadoras da lignina (lignolíticas), pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam a produção de hidrolases nos macro-basidiomicetos (KOBAKHIDZE et al., 2016).

Para as hemicelulases, principalmente xilanase, os macro-basidiomicetos exibem maiores atividades, uma vez que a xilana está ligada a lignina e celulose. Um número considerável de xilanases comumente encontradas em ascomicetos foram identificadas também em macro-basidiomicetos, incluindo α e β -galactosidases, α -arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil-xilana esterases, uma pectina-metil esterase e feruloil-esterases (RYTIOJA et al., 2014; YULIANA et al., 2019).

Assim, por vezes estes fungos secretam *pools* de xilanases para desconstruir a hemicelulose, liberando monômeros de açúcares e “espaço” na fibra para alcançar a celulose/glicose. Neste trabalho, a melhor atividade de xilanase observada aos 6 dias ($8,38 \pm 0,01 \text{ UI.g}^{-1}$) ocorreu no cultivo de *Pleurotus* sp. FPB-109 e depois em *Flavodon flavus* FPB-04 ($6,10 \pm 0,006 \text{ UI.g}^{-1}$), em seguida, aos 13 e 26 dias as maiores atividades ocorreram nos cultivos de *Coprinus* sp. FPB-125 e *Pleurotus* sp. FPB-109, respectivamente (FIGURA 24 B).

Ressalta-se ainda que as atividades enzimáticas de celulases e xilanases são dependentes da composição do substrato (GONZÁLEZ-BAUTISTA et al., 2017). Foi verificado que a produção de celulase por *Pleurotus djamor*, por exemplo, foi maior durante fermentação no sistema FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato enquanto que o aumento de xilanase se deu utilizando farelo de trigo (PREMKUMAR et al., 2018).

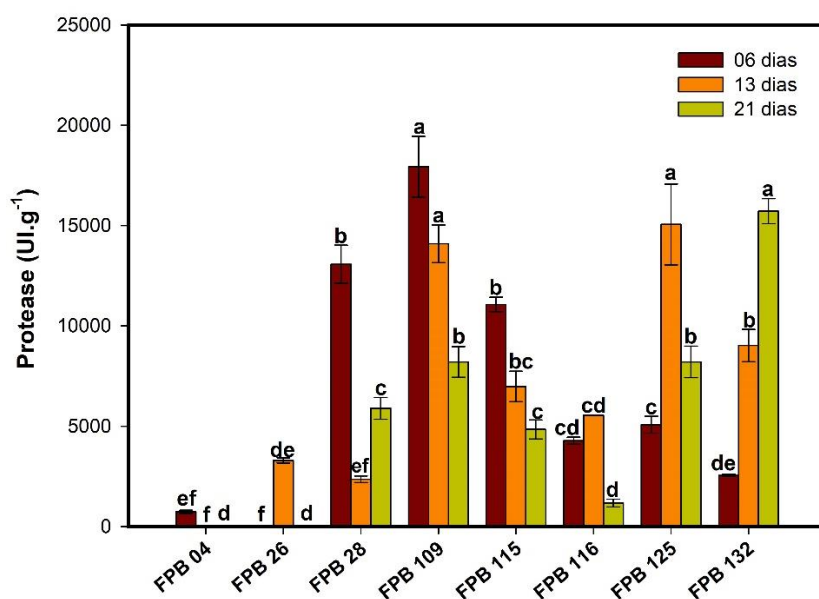
Em outro caso, a utilização de uma fermentação sólido/líquida sequencial (FES seguida da adição de meio líquido para fermentação submersa (FS), empregando-se sabugo de milho como substrato no cultivo de *Pleurotus ostreatus*, resultou em maiores atividades de endoglucanase ($3.152 \pm 139 \text{ UI L}^{-1}$) e xilanase ($3.064 \pm 40 \text{ U.L}^{-1}$) (AN et al., 2016).

Quando cultivado em palha de arroz (FES), o basidiomiceto modelo *Coprinopsis cinerea* exibiu um pequeno aumento de atividade de xilanase aos seis dias de cultivo atingindo nível máximo aos 9 dias ($0,57 \text{ UI.mL}^{-1}$) havendo diminuição gradual até o 15º dia (ZHANG et al., 2018).

3.6 Atividade proteolítica – macro-basidiomicetos

Os EBEs obtidos com os cultivos dos macro-basidiomicetos apresentaram atividade proteolítica nas condições testadas (FIGURA 24). Aos 6 dias de cultivo, a maior atividade ocorreu para *Pleurotus* sp. FPB-109 (17.925 UI.g^{-1}) seguido de *Fomes fasciatus* FPB-28 (13.071 UI.g^{-1}) e *Trametes* sp. FPB-115 (11.069 UI.g^{-1}). Aos 13 dias as maiores atividades ocorreram para os cultivos de *Coprinus* sp. FPB-125 (15.052 UI.g^{-1}) e *Pleurotus* sp. FPB-109 (14.088 UI.g^{-1}). Já aos 21 dias de cultivo, outro *Pleurotus* sp. FPB-132 apresentou a maior atividade (15.720 UI.g^{-1}), acompanhado pelo *Pleurotus* sp. FPB-109 (8.205 UI.g^{-1}) e *Coprinus* sp. FPB-125 (8.201 UI.g^{-1}).

Figura 25 – Perfil de protease nos EBEs dos macro-basidiomicetos



Legenda: EBEs obtidos pelo cultivo dos macro-basidiomicetos em CVD (Sistema FES-1 modificado) a 28°C e 65% (± 5) de umidade em três tempos de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os EBEs dentro de cada tempo com base no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

As enzimas proteolíticas têm grande apelo comercial uma vez que apresentam aplicações no processamento de alimentos, panificação, sucos e produção de queijos (FONSECA; BARRONCAS; TEIXEIRA, 2014). Nas condições testadas do presente trabalho, verificamos que as maiores atividades encontradas ocorreram nas espécies de macro-basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, corroborando com informações da literatura.

Vários tipos de proteases de macro-basidiomicetos vêm sendo investigadas (metaloproteases, proteases aspárticas e proteases de serina) (FARACO et al., 2005). Cerca de 90% das proteases comercializadas são de origem microbiana, aquelas provenientes de macro-basidiomicetos, principalmente de espécies do gênero *Pleurotus*, vem ganhando atenção na busca por enzimas para aplicação principalmente, no processamento do couro (INÁCIO et al., 2015).

A protease presente no extrato bruto de *P. pulmonarius* mostrou-se eficaz em três substratos testados: cabelo, penas e pele bovina. Além disso, a utilização de cabelo humano como substrato em FES evidenciou ação queratinolítica do fungo comprovada por imagens de microscopia eletrônica de varredura (INÁCIO et al., 2018).

O cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) (FES) em batatas pré-tratadas (KOH ou água destilada) como substrato, levou a produção de protease extracelular. A partir do 7º

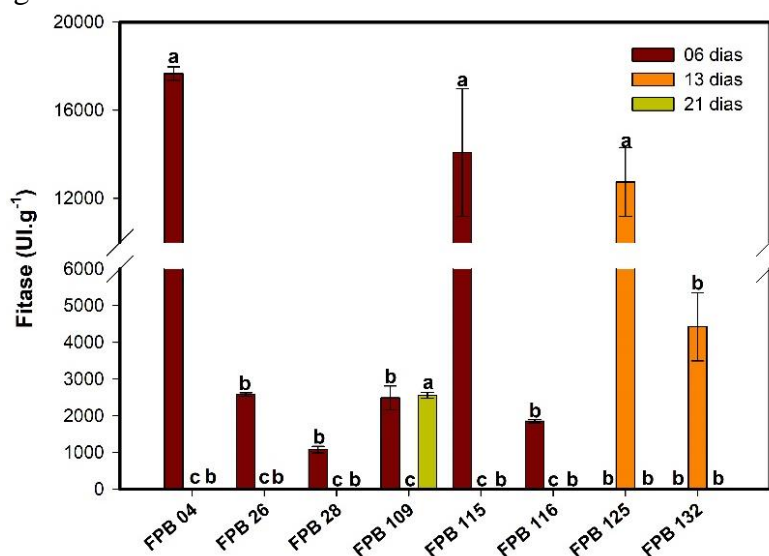
dia a atividade proteolítica entrou em declínio enquanto as lignolíticas (lacase, peroxidase de manganês, peroxidase de lignina e oxidases do aril álcool), aumentaram significativamente (ERGUN; UREK, 2017).

Também foi verificada produção de proteases nos corpos de frutificação de *Lentinus citrinus*, havendo produção de 463,55 U mL⁻¹ quando cultivado no sistema FES empregando-se substrato composto por exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e serapilheira (MACHADO et al., 2016). Há algumas informações mostrando que, além de compostos bioativos produzidos por macrofungos do gênero *Lentinus*, as proteases atuam como reguladoras da morfogênese, fisiologia e metabolismo dos cogumelos (SINGHAL; NIGAM; VIDYARTHI, 2012; SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

3.7 Atividade de fitases - macro-basidiomicetos

Foi observada atividade de fitases nos EBEs dos macro-basidiomicetos ao longo do período experimental. Aos 6 dias observou-se maior atividade para *Flavodon flavus* FPB-04 (17.664,2 UI.g⁻¹), em seguida, *Trametes* sp. FPB-115 (14.082,8 UI.g⁻¹). Aos 13 dias a maior atividade ocorreu no cultivo de *Coprinus* sp. FPB-125 com (13.991,1 UI.g⁻¹) e aos 21 dias, houve atividade apenas no cultivo de *Pleurotus* sp. FPB-109 (2.552,06 UI.g⁻¹) (FIGURA 26).

Figura 26 – Perfil de fitase nos EBEs dos macro-basidiomicetos



Legenda: EBEs de macro-basidiomicetos cultivados CVD (Sistema FES-1 modificado) a 28°C e 65% (± 5) de umidade em três tempos de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os EBEs dentro de cada tempo com base no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

A fitase (mio-inositol-hexaqui-fosfato fosfohidrolase, EC 3.1.3.8) catalisa a liberação do fosfato de fitato (mio-inositol hexaqui-fosfato), o qual é a principal forma de fósforo existente em grãos cereais, legumes e sementes oleaginosas. O emprego de fitases em rações de monogástricos tem a finalidade de melhorar a digestibilidade das proteínas aumentando a disponibilidade de fósforo e outros minerais que são quelados pelo ácido fítico (KONIETZNY; GREINER, 2002), reduzindo assim, os fatores antinutricionais e prevenindo a poluição do meio ambiente, em função da lixiviação do fitato presente nas formulações de rações e não absorvido por animais monogástricos.

Existem vários organismos produtores de fitases (plantas, bactérias, leveduras e muitas espécies de fungos filamentosos). Os fungos mais utilizados para produção desta enzima pertencem ao gênero *Aspergillus* (COBAN; DEMIRCI; TURHAN, 2015), entre os macro-basidiomicetos foram identificados genes que codificam fitases em *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Flavodon flavus* e *Trametes pubescens* (LASSEN et al., 2001). Nesse sentido, uma caracterização molecular envolvendo diferentes classes de fungos, evidenciou diferenças nas sequências de aminoácidos de fitases de ascomicetos e macro-basidiomicetos (GONTIA-MISHRA; TIWARI, 2013).

No trabalho de Collopy e Royse (2004) os cogumelos comestíveis *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* e *Pleurotus cornucopiae* exibiram atividade de fitase em seus tecidos contudo, com níveis inferiores a 0,5 UI.g⁻¹ além disso, a avaliação do SMS não indicou atividade da enzima.

Em uma triagem envolvendo 50 macro-basidiomicetos do Sul da Índia, *Antrodiella semisurpiforme*, *Craterellus cornucopioides* e *Gomophus clavitus* foram identificados como produtores de fitase, contudo, a atividade foi avaliada apenas em placa de Petri (visual) (GOUD et al., 2009). Em outro estudo, *P. ostreatus* apresentou maior atividade de fitase 0,66 UI.mL⁻¹ em relação a outros 9 fungos quando cultivado em palha de trigo (HASSAN; ABDEL-JUBOURI, 2018).

Schizophyllum sp. isolado no Brasil apresentou alta atividade de fitase quando cultivado sobre farelo de trigo 55,5 U mL⁻¹ no produto concentrado líquido e 6.240 U g⁻¹ de produto em pó formulado, apresentando estabilidade mesmo depois de formulada e estocada (SALMON et al., 2011).

A partir dos resultados obtidos verificou-se que o substrato lignocelulósico cacheo vazio de dendê nas condições de cultivo e ensaio de atividade, levou a alta produção de fitase por algumas linhagens de macro-basidiomicetos, incentivando a avaliação dos

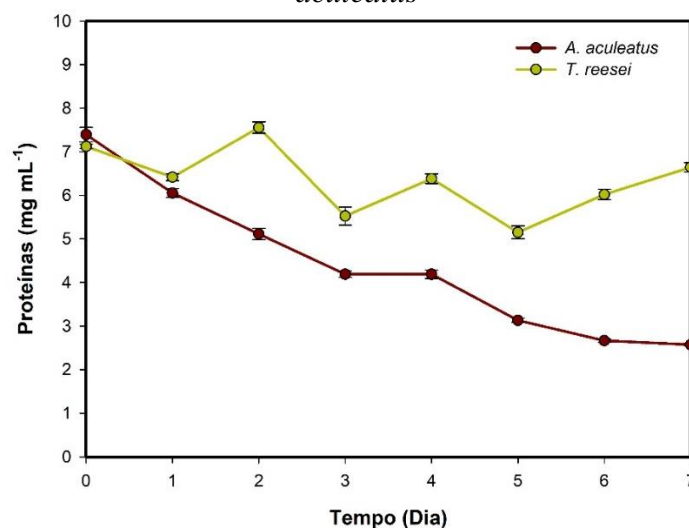
mesmos em outros substratos contendo fitato. Além disso, ressalta-se que o cacho vazio não foi caracterizado em relação a presença/ausência de fitato.

3.8 Proteínas totais e enzimas celulolíticas dos EBEs - ascomicetos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus aculeatus*

O teor de proteínas solúveis totais dos extratos de *T. reesei* e *A. aculeatus* ao longo do período de cultivo foi verificado (FIGURA 27). Aos 7 dias após a inoculação o extrato de *T. reesei* foi o que apresentou maior teor de proteínas solúveis ($6,64 \text{ mg.mL}^{-1}$) em relação a *A. aculeatus*.

A caracterização da borra do decantador de óleo de dendê (*tridecanter*), utilizada como suplemento do meio basal, indicou que a mesma apresenta um teor de $15,44\% \pm 0,17$ de proteínas justificando o elevado teor de proteínas solúveis totais apresentado no início do experimento. Ao longo do tempo observamos oscilações no conteúdo de proteína para extrato de *T. reesei* enquanto para *A. aculeatus* houve queda até o 7º dia nas condições testadas.

Figura 27 – Perfil de proteínas solúveis totais nos EBEs dos ascomicetos *T. reesei* e *A. aculeatus*



Legenda: EBEs dos ascomicetos *T. reesei* e *A. aculeatus* cultivados em meio Mandels e Weber (1969) suplementado com borra de dendê (Fermentação submersa a 28°C e 150 rpm) em 7 tempos de coleta.

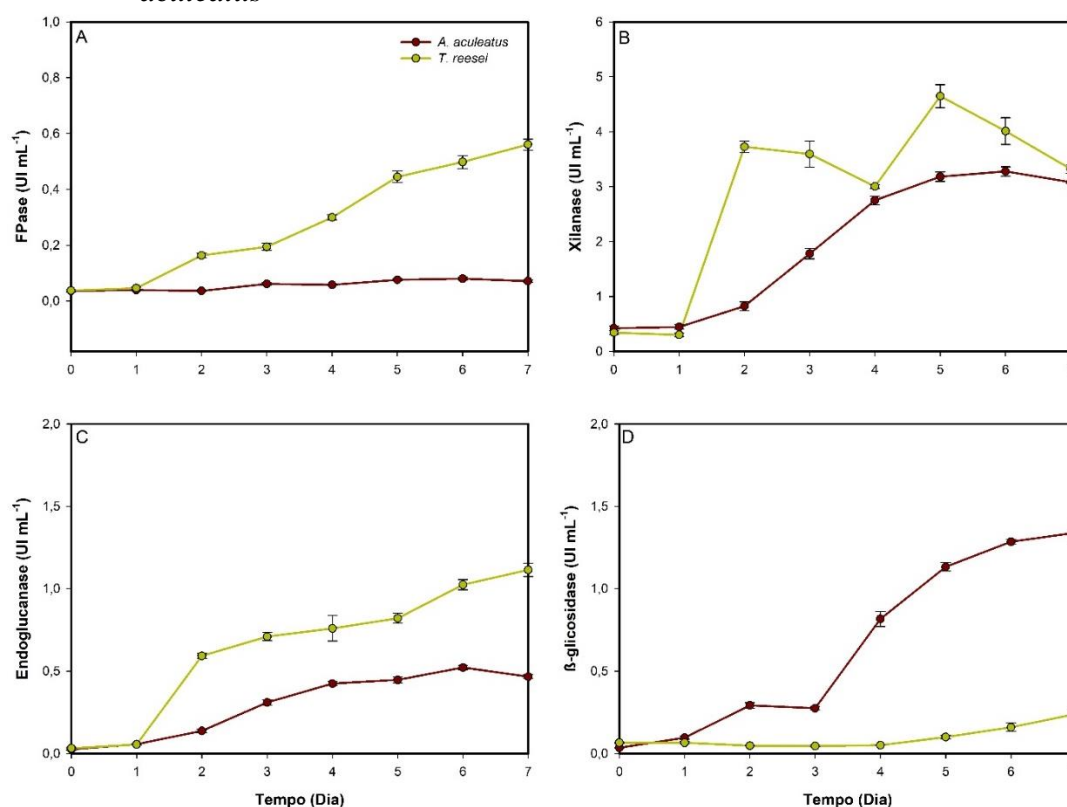
Fonte: Do autor (2019).

Para as enzimas holocelulolíticas, os resultados são mostrados na Figura 28 A-D. A atividade de FPase se manteve estável para *A. aculeatus* chegando a $0,071 \text{ UI.mL}^{-1}$ aos 7 dias. Já *T. reesei*, apresentou aumento na atividade a partir de 24 horas após a

inoculação ($0,046 \text{ UI.mL}^{-1}$) chegando a $0,56 \text{ UI.mL}^{-1}$ aos 7 dias (FIGURA 28 A). A atividade de xilanase apresentou aumento ao longo do tempo para ambos os fungos, no entanto, *T. reesei* apresentou a maior atividade ($3,32 \text{ UI.mL}^{-1}$) em relação *A. aculeatus* ($3,08 \text{ UI.mL}^{-1}$) (FIGURA 28 B).

No final do cultivo, a maior atividade de endoglucanase foi observada para *T. reesei* ($1,11 \text{ UI.mL}^{-1}$) enquanto *A. aculeatus* apresentou $0,46 \text{ UI.mL}^{-1}$ (FIGURA 27 C), já em relação a atividade de β -glicosidase, observou-se o inverso, maior atividade para *A. aculeatus* ($1,34 \text{ UI.mL}^{-1}$) e menor para *T. reesei* ($0,24 \text{ UI.mL}^{-1}$) aos 7 dias de cultivo (FIGURA 27 D).

Figura 28 – Perfil de enzimas holocelulolíticas nos EBEs dos ascomicetos *T. reesei* e *A. aculeatus*



Legenda: EBEs dos ascomicetos *T. reesei* e *A. aculeatus* cultivados em meio Mandels e Weber (1969) suplementado com borra de dendê (Fermentação submersa a 28°C e 150 rpm) em 7 tempos de coleta.

Fonte: (Do autor).

Dentre os organismos produtores de celulases, os fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* são os que mais se destacam sendo, portanto, utilizados para produção deste grupo de enzimas em escala industrial (IMRAN et al., 2018; KHOKHAR et al., 2012; MUTHUKRISHNAN, 2017; SRIVASTAVA et al., 2018).

Nesse contexto, o fungo *T. reesei* é um fungo com alta produtividade de diferentes metabólitos, incluindo celulasas (endoglucanase) e hemicelulasas (xilanase) (KESHAVARZ; KHALESI, 2016; QIN et al., 2008), contudo, apresenta baixa atividade de β -glucosidase. Por outro lado, *A. aculeatus* apresenta melhor produção desta enzima (KAWAGUCHI et al., 1996), motivando a adição da mesma em coquetéis celulolíticos para promover a sacarificação da biomassa (BABA et al., 2015).

Estas informações corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho onde verificamos maior produção de endoglucanase e xilanase por *T. reesei* e β -glucosidase por *A. aculeatus* em meio de cultura (MANDELS; WEBER, 1969), enriquecido com borra de dendê (PELÁEZ, 2017).

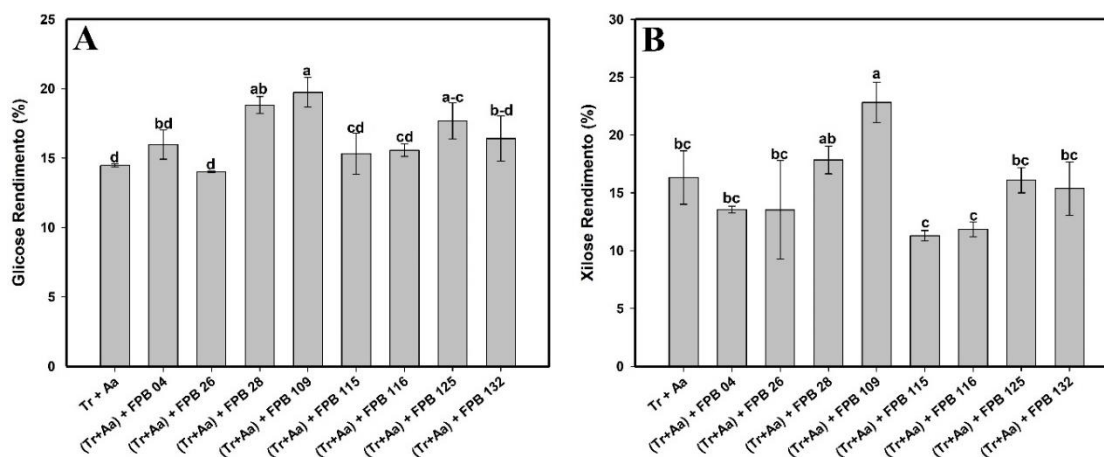
Desse modo, a biomassa lignocelulósica borra de dendê se mostrou promissora como aditivo de meios de cultura para produção de celulasas nas condições testadas. Este material apresenta 18,22% de celulose em sua composição. Por isso, pode ser uma alternativa limpa e de baixo custo para aproveitamento em cultivos. Semelhantemente, o emprego de outros resíduos agroindustriais em meios de culturas tem sido recorrente em trabalhos de pesquisa com estes fungos, visando a produção de celulasas (DE SOUZA; DA SILVA BON; DA SILVA, 2018; DEVI; KUMAR, 2017; LAI et al., 2017; WANG, W.; KANG; LEE, 2010; WEN; LIAO; CHEN, 2005).

3.9 Coquetéis ou combinações de extratos enzimáticos de fungos macrobasidiomicetos e ascomicetos

A realização de um combo ou coquetel enzimático entre as espécies de macrobasidiomicetos crescidos em cacho de dendê e duas espécies de ascomicetos comerciais (notadamente produtoras de celulasas e hemicelulasas) foi realizada com objetivo de observar o potencial de liberação de glicose e xilose junto a hidrólise do cacho pré-tratado hidrotermicamente (CVD-AH) (FIGURA 29).

Os melhores rendimentos de glicose foram observados no combo [(Tr + Aa) + *Pleurotus* sp. FPB-109] com $19,7 \pm 1,0$ seguido dos combos com *Fomes fasciatus* FPB-28 ($18,8 \pm 0,6\%$) e *Coprinus* sp. FPB-125 ($17,6 \pm 1,2\%$). Estes combos diferiram estatisticamente do controle (Tr +Aa) com $14,4 \pm 0,1\%$, O maior rendimento de xilose também foi observado no combo [(Tr + Aa) + *Pleurotus* sp. FPB-109] com $22,8 \pm 1,75\%$, seguido novamente pelo combo *Fomes fasciatus* FPB-28 ($17,8 \pm 1,2\%$).

Figura 29 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com o coquetel 1.



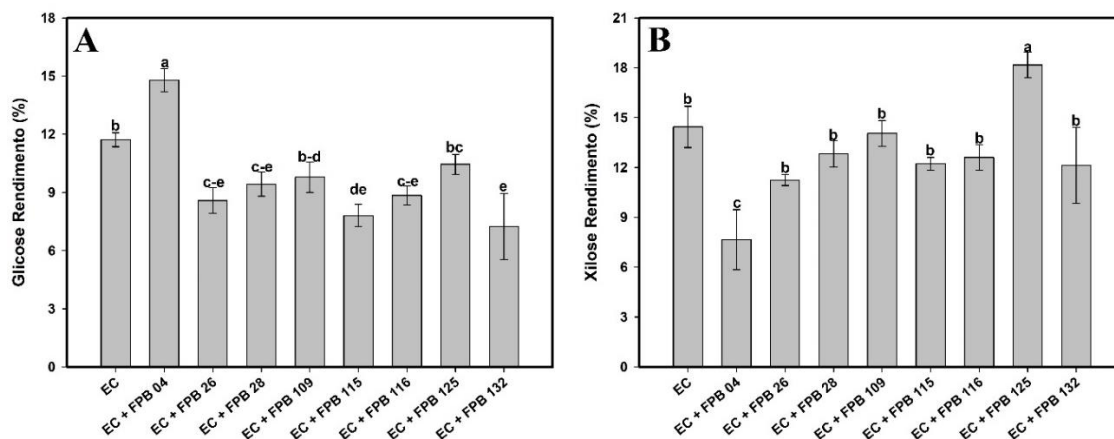
Legenda: glicose (A) e Xilose (B) do CVD-AH após hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C por 24 h utilizando a combinação EBE de macro-basidiomicetos (12,69 mL.g⁻¹ de substrato) e EBE dos ascomicetos *T. reesei* (0,65% de 12,5 mg.g⁻¹) (Tr) e *A. aculeatus* (0,35% de 12,5 mg.g⁻¹) (Aa). Os dados mostrados representam as médias de análises realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Do autor (2019).

Os resultados obtidos na hidrólise do cacho pré-tratado hidrotérmicamente (CVD-AH), utilizando a combinação de extratos brutos enzimáticos (EBE) dos 08 macro-basidiomicetos e enzimas comerciais *Celluclast*® (*Cellulase*) e *Novozyme-188* (*Cellobiase*) Sigma-Aldrich (EC) a 50 °C durante 24 horas estão exibidos na Figura 30.

O maior rendimento de glicose ($14,78 \pm 0,6\%$) ocorreu para a combinação [*Flavodon flavus* FPB-04 + (EC)] diferindo estatisticamente do controle constituído apenas com as enzimas comerciais (EC) ($11,7 \pm 0,36\%$) (FIGURA 30 A). Em relação a xilose, o maior rendimento foi verificado na combinação [(EC) + *Coprinus* sp. FPB-125] ($18,17 \pm 0,75\%$) diferindo estatisticamente do controle (EC) ($14,44 \pm 1,24\%$) (FIGURA 30 B).

Figura 30 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com o coquetel 2.



Legenda: glicose (A) e rendimento de xilose (B) do CVD-AH após hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C por 24 h utilizando a combinação: Enzimas comerciais *Cellulase* (0,65% de 12,5 mg.g⁻¹) e *Cellobiase* (0,35% de 12,5 mg.g⁻¹) (EC) e EBE de macro-basidiomicetos (12,69 mL.g⁻¹). Os dados mostrados representam as médias de análises realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

A baixa produtividade e alto custo de coquetéis enzimáticos estão entre as dificuldades encontradas na produção de etanol celulósico, por exemplo (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012). Os estudos que visam obtenção de celulases para aplicação industrial, envolvem principalmente, a utilização dos fungos filamentosos *T. reesei* e *A. aculeatus* (KUHAD et al., 2016).

A hidrólise dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica pode ser mais efetiva através da criação de um coquetel de enzimas derivadas de diferentes fungos (METREVELI et al., 2017). Com isso, o desenvolvimento e otimização de coquetéis enzimáticos tem se mostrado uma área ativa de pesquisa (MORRISON; ELSHAHED; YOUSSEF, 2016). Como se sabe, os macro-basidiomicetos apresentam em seu arcabouço enzimático, enzimas lignolíticas e celulolíticas. Além disso, ao colonizarem um substrato, produzem substâncias que podem apresentar ação sinérgica quando combinadas com enzimas comerciais (VALADARES et al., 2016; WANG, Y. et al., 2018).

Algumas iniciativas devem ser tomadas a fim de tornar a conversão da biomassa economicamente viável, como por exemplo, otimizar as condições de cultivo para obtenção de maiores quantidades de enzima, como menor custo. A produção de celulases por três estirpes de *Trichoderma*, por exemplo, foi melhorada por um método de fermentação sequencial (FLORENCIO et al., 2015). O emprego dos resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar) em meios de cultivo para *A. niger*, também contribuiu para produção de enzimas hidrolíticas

apresentando melhor desempenho na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar (CUNHA et al., 2017).

Além disso, a mistura de enzimas de diferentes microrganismos pode promover melhora no rendimento de hidrólises, como por exemplo, a adição de extratos produzidas por *Aspergillus* sp. (rico em β -glicosidasas) às celulases de *Trichoderma* sp. (BABA et al., 2015; CHYLENSKI et al., 2017). Com base nisso, a formulação de coquetéis enzimáticos com diferentes classes de enzimas, oriundas de diferentes fungos, tem sido incentivada com objetivo de melhorar o rendimento da sacarificação de biomassas lignocelulósicas (LOPES; FERREIRA FILHO; MOREIRA, 2018; SAINI et al., 2016).

Pelo fato de naturalmente produzirem lacases e peroxidases, os macro-basidiomicetos despertam interesse para produção enzimática e adição em coquetéis. Nesse sentido, um coquetel de enzimas lignolíticas de *Ganoderma lucidum* foi imobilizado em esferas de alginato-quitosana por glutaraldeído, e, demonstrou redução no teor de lignina em resíduos vegetais para obtenção de açúcares fermentescíveis, além da clarificação de sucos (BILAL et al., 2017). Em outro caso, um coquetel composto pela mistura dos extratos enzimáticos dos fungos *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *T. versicolor*, *P. sanguineus* e *P. chrysosporium* promoveu aumento na atividade de FPAse, demonstrando que há uma complementação entre os extratos que pode ser viável na sacarificação de biomassas vegetais (CARDOSO et al., 2018).

Para Elisashvili e colaboradores (2011), o que se espera em uma triagem racional de macro-basidiomicetos é encontrar linhagens que produzam misturas sinérgicas de enzimas hidrolíticas e oxidativas (ELISASHVILI et al., 2011). Isto tem incentivado muitos grupos, incluindo nosso grupo de trabalho, a investigar a efetividade dos extratos enzimáticos na hidrólise de biomassas de linhagens de macro-basidiomicetos, cultivados em diferentes substratos lignocelulósicos (monocultivos ou co-cultivos) (PELÁEZ, 2017).

Nesse sentido, nossos resultados indicaram um efeito positivo no rendimento de glicose e xilose com a adição dos EBEs de *Pleurotus* sp. FPB-109 e *Fomes fasciatus* FPB-28, a extratos produzidos por dois fungos conhecidamente celulolíticos *T. reesei* e *A. aculeatus*. Já na combinação com enzimas comerciais, *Flavodon flavus* FPB-04 apresentou efeito positivo no rendimento de glicose enquanto *Coprinus* sp. FPB-125 proporcionou aumento no rendimento de xilose.

Considerando que o CVD-AH não foi lavado mantendo parte da lignina solúvel adsorvida nas fibras, isto pode ter dificultado a hidrólise enzimática. Além disso, este

material apresentou teor de lignina de 42% (em base seca). A lignina desempenha um papel negativo no processo de conversão da biomassa lignocelulósica (ZENG et al., 2014).

De certa forma, isso nos incentivou a manter o CVD-AH sem lavar a fim de verificar a atuação dos extratos dos macro-basidiomicetos (com presença de enzimas ligninolíticas), frente a lignina que eventualmente ficou adsorvida nas fibras do cacho pré-tratadas por autohidrólise. Desse modo, combinações de pré-tratamento biológico (macro-basidiomicetos) e/ou físicos ou químicos, podem ser estratégias interessantes para serem utilizadas e facilitar a ação de coquetéis enzimáticos (DA SILVA MACHADO; FERRAZ, 2017; DAI et al., 2015; MARTÍNEZ-PATIÑO et al., 2018; SAHA et al., 2017).

Em uma abordagem próxima a do nosso estudo, Wang e colaboradores (2018) relataram efeito sinérgico do extrato enzimático do basidiomiceto *Echinodontium taxodi* juntamente com uma enzima comercial, melhorando a hidrólise da palha de milho. Nas condições avaliadas no presente estudo, o efeito positivo promovido pelo extrato enzimático de *Flavodon flavus* FPB-04 em comparação com os demais fungos juntamente com EC, sugere a presença de enzimas que atuam de forma sinérgica com as enzimas *Celluclast* e *Novozymes-188*. O fato é que há um incremento enzimático proporcionado pelos extratos destes fungos que carece de mais elucidacões (CARDOSO et al., 2018). Além do mais, os resultados foram obtidos apenas com os EBEs sem nenhum processo de otimização demonstrando influências positivas nas condições avaliadas.

Além de enzimas lignolíticas e celulolíticas, os macrofungos são capazes de secretar enzimas acessórias que facilitam a hidrólise de materiais lignocelulósicos como LPMOs (GUPTA et al., 2016) e expansinas (ZHU et al., 2016). Ainda há muito a ser explorado e elucidado, pois, muitas substâncias presentes nos extratos brutos ainda permanecem desconhecidas e podem influenciar na efetividade de coquetéis enzimáticos (WANG, Y. et al., 2018).

Inclusive, apesar da vantagem de um coquetel contendo várias classes de enzimas (lignolíticas, celulolíticas), existem desafios pois cada enzima apresenta estabilidade térmica e uma faixa de pH ótimo (WOOLRIDGE, 2014). A inibição ocasionada pelos produtos da hidrólise (glicose e celobiose) também é reportada (ANDRIĆ et al., 2010).

A própria lignina das biomassas pré-tratadas a altas temperaturas atua como barreira residual, limitando a hidrólise enzimática para obtenção etanol celulósico (PETRIDIS; SCHULZ; SMITH, 2011). Dessa forma, o fato de o CVD ser submetido a

autoclavagem antes da retirada dos frutos (processo industrial) e posteriormente o pré-tratamento hidrotérmico (neste trabalho), pode ter contribuído para o colapso da lignina reduzindo assim, a eficiência da hidrólise do material nas condições testadas.

A diversificação de estratégias devem continuar para melhor elucidar a composição de coquetéis ou adições de diferentes enzimas em diferentes momentos da hidrólise e condições, tais como temperatura, agitação, ou seja, um sistema híbrido (inglês, *hybrid hydrolysis and fermentation* - HHF) (OLIVA-TARAVILLA et al., 2016; RAJ; KRISHNAN, 2019).

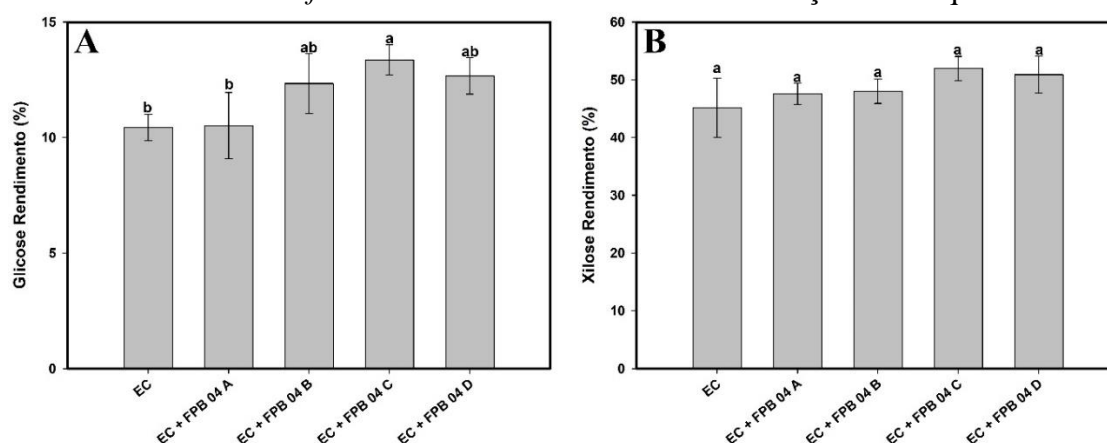
Portanto, é preciso continuar trabalhando na seleção de fungos potenciais para desenvolvimento de coquetéis eficientes. Entre as estratégias adicionais, tem-se a engenharia metabólica e engenharia de tensão para melhora da produção enzimática. Estas abordagens conseguiram muitos avanços nos últimos anos com aplicação de ferramentas emergentes de edição de genoma baseado em CRISPR-Cas9 e biologia sintética (KUN et al., 2019; ZHAO et al., 2018). Inclusive, os macro-basidiomicetos são fontes de genes de interesse industrial (FLOUDAS et al., 2012; SKYBA et al., 2016).

A partir dos resultados obtidos até o momento, incluindo aspectos morfológicos durante os cultivos como velocidade de crescimento e vigor (visual), perfil enzimático, combinações com enzimas comerciais e/ou enzimas de fungos comerciais, espécies nativas do cerrado brasileiro com poucos ou nenhum trabalho ainda realizado quanto ao potencial biotecnológico, as linhagens selecionadas neste capítulo foram *Flavodon flavus* FPB-04 e *Fomes fasciatus* FPB-28, para dar continuidade a outros ensaios, cujos resultados se encontram nos tópicos subsequentes.

3.10 Efeito da concentração de EBE dos macro-basidiomicetos *Flavodon flavus* FPB-04 e *Fomes fasciatus* FPB-28 na mistura com EBE de ascomicetos ou enzimas comerciais

Os resultados das hidrólises com EBEs concentrados de *Flavodon flavus* FPB-04 estão mostrados na Figura 31. No coquetel com EC, em relação ao controle o melhor rendimento de glicose ocorreu para [(EC) + (EBE-C)] ($13,3 \pm 0,65\%$) (FIGURA 31 A), já em relação ao rendimento de xilose, não houve diferença significativa (FIGURA 31 B).

Figura 31 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com EBE de *Flavodon flavus* FPB-04 em diferentes concentrações no coquetel 1.

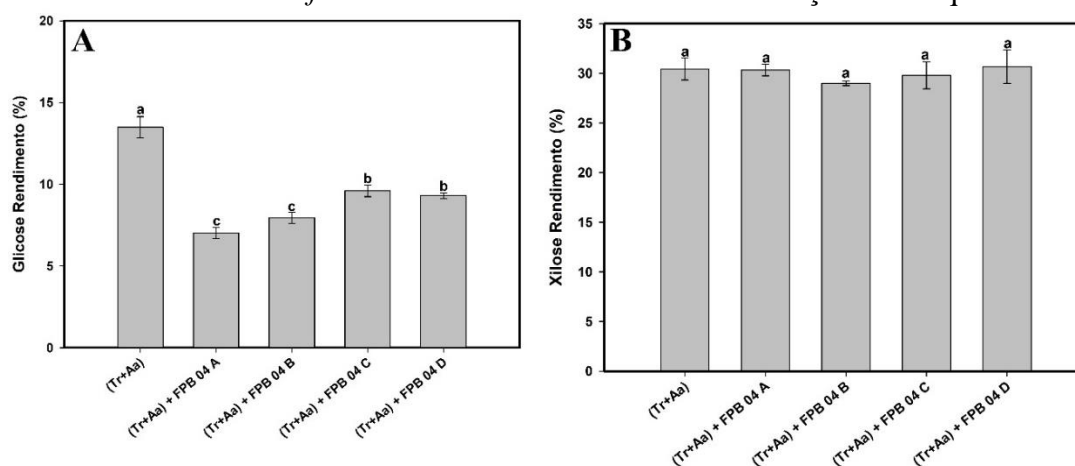


Legenda: Glicose (A) e xilose (B) do CVD-AH após hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C por 24 h utilizando a combinação: Enzimas comerciais *Cellulase* (0,65% de 12,5 mg.g⁻¹) e *Cellobiase* (0,35% de 12,5 mg.g⁻¹) (Sigma-Aldrich) (EC) e EBE de FPB-04 (12,69 mL.g⁻¹) nas concentrações A-D. Os dados mostrados representam as médias de análises realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Do autor (2019).

Em relação a mistura com EBE de ascomicetos (Tr+Aa) os resultados estão apresentados na Figura 32, tanto o extrato sem concentrar como as concentrações testadas, não superaram o rendimento do controle que levou ao rendimento de 13,4 ± 06% de glicose (FIGURA 32 A). Em relação a xilose, não houve diferença significativa entre os tratamentos (FIGURA 32 B).

Figura 32 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com EBE de *Flavodon flavus* FPB-04 em diferentes concentrações no coquetel 2.

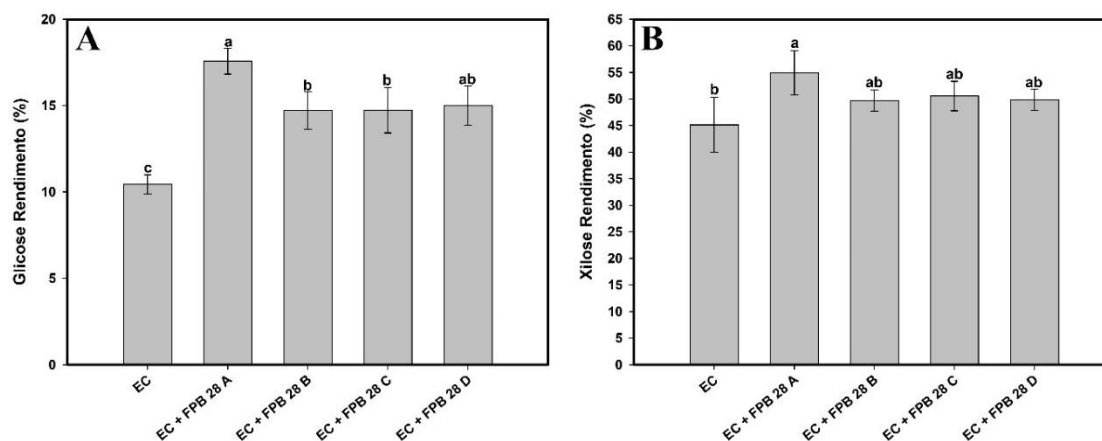


Legenda: glicose (A) e rendimento de xilose (B) do CVD-AH após hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C por 24 h utilizando a combinação: EBE dos ascomicetos *T. reesei* (0,65% de 12,5 mg.g⁻¹) e *A. aculeatus* (0,35% de 12,5 mg.g⁻¹) (Tr+Aa) com EBE de FPB-04 (12,69 mL.g⁻¹) nas concentrações A-D. Os dados mostrados representam as médias de análises realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Do autor (2019).

Em relação ao EBE de FPB 28 e a influência da concentração na combinação com EC, os resultados estão na Figura 33. O extrato concentrado EBE (A) promoveu melhora no rendimento de glicose quando comparado com o controle ($17,5 \pm 0,7\%$) (FIGURA 33 A), também em relação a xilose ($54,9 \pm 4,1\%$) (FIGURA 33 B).

Figura 33 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com EBE de *Fomes fasciatus* FPB-28 em diferentes concentrações no coquetel 1.

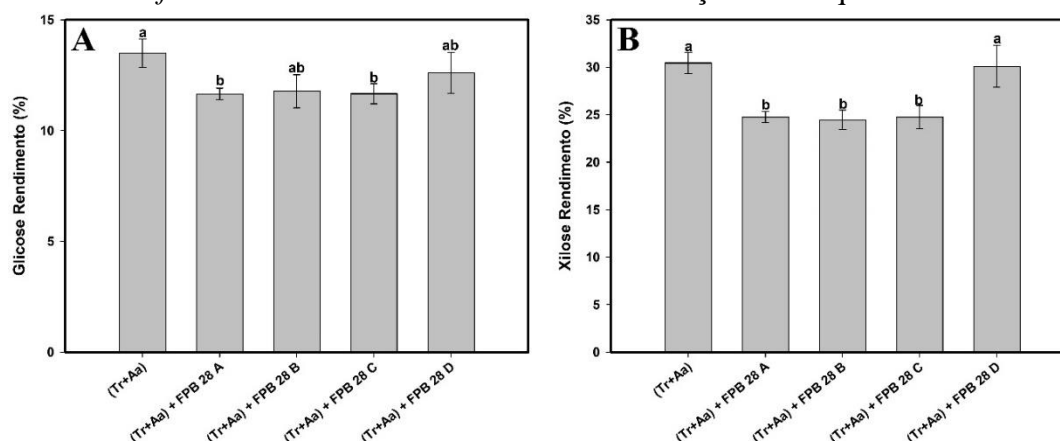


Legenda: glicose (A) e rendimento de xilose (B) do CVD-AH após hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C por 24 h utilizando a combinação: Enzimas comerciais *Cellulase* ($0,65\%$ de $12,5 \text{ mg.g}^{-1}$) e *Cellobiase* ($0,35\%$ de $12,5 \text{ mg.g}^{-1}$) (Sigma-Aldrich) (EC) e EBE de FPB-28 ($12,69 \text{ mL.g}^{-1}$) nas concentrações A-D. Os dados mostrados representam as médias de análises realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

Na combinação com EBE dos ascomicetos (Tr+Aa), o controle apresentou maior valor no rendimento de glicose ($13,4 \pm 0,6\%$) (FIGURA 34 A) enquanto que no rendimento de xilose, o extrato sem concentrar não apresentou diferença significativa em relação ao controle apresentando rendimento de $30,08 \pm 2,2\%$ (FIGURA 34 B).

Figura 34 – Rendimento (%) de açúcares após hidrólise do CVD-AH com EBE de *Fomes fasciatus* FPB-28 em diferentes concentrações no coquetel 2.



Legenda: glicose (A) e rendimento de xilose (B) do CVD-AH após hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C por 24 h utilizando a combinação: EBE dos ascomicetos *T. reesei* (0,65% de 12,5 mg.g⁻¹) e *A. aculeatus* (0,35% de 12,5 mg.g⁻¹) (Tr+Aa) com EBE de FPB-28 (12,69 mL.g⁻¹) nas concentrações A-D. Os dados mostrados representam as médias e desvio padrão de análises realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Do autor (2019).

Após a obtenção de enzimas produzidas por macro-basidiomicetos, o procedimento sequencial geralmente é a separação e purificação. Esta etapa é conhecida como *downstream* e representa cerca de 60% dos custos de produção. Adicionalmente, são incluídos os métodos de extração, concentração, purificação e estabilização (PERALTA et al., 2017).

Anteriormente verificamos efeito positivo dos extratos de *F. flavus* 04 e *F. fasciatus* FPB-28 (12,69 mL.g⁻¹) o que correspondeu a aproximadamente 1,2 mL do EBE. Como não foi possível aumentar a quantidade de EBE em função da limitação do volume reacional, a estratégia aqui consistiu em concentrar em 5x os extratos antes de adicioná-los às misturas enzimáticas a fim de verificar melhoras nos rendimentos da HE.

No experimento realizado, os extratos de *Flavodon flavus* FPB-04 e *Fomes fasciatus* FPB-28, não passaram por nenhum processo de purificação e separação antes da etapa de concentração e de modo geral, observou-se efeito positivo quando adicionados às enzimas comerciais *Celluclast* e *Novozymes-188*, contudo, quando combinados com o EBE de *A. aculeatus* e *T. reesei*, não foram encontrados resultados superiores àqueles obtidos anteriormente.

A quantidade de enzimas empregadas nas hidrólises deve ser estudada afim de reduzi-las sem comprometer os rendimentos de açúcares fermentescíveis. Nesse sentido, a menor concentração possível das enzimas comerciais *Celluclast* 1.5, *Novozyme-188* e

Pectinex Ultra SP em coquetéis foram avaliadas durante hidrólise de resíduos de casca de laranja, observando-se que a redução na concentração resultou em menor taxa de reação inicial e queda no rendimento, além disso, o processo de sacarificação se deu mais lentamente ao decorrer do processo (DE LA TORRE et al., 2017).

Em um estudo de pré-otimização, a enzima *Cellic CTec2* (Novozymes), levou a um maior rendimento de conversão de celulose a glicose, quando utilizada em baixa carga enzimática e em elevado teor de sólidos totais, durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar (RAMOS et al., 2015)

As celulasas e enzimas auxiliares, tendem a adsorver em superfícies lignocelulósicas, criando zonas com alta concentração proteica e causando redução das atividades médias por “superlotação” ou “interferência” ocasionando dessa forma, redução significativa da hidrólise (EIBINGER et al., 2014). Em contrapartida, a adição de proteínas não enzimáticas como a albumina de soro bovino (BSA) em sistema de fermentação e sacarificação simultânea (SSF), demonstrou ser eficaz melhorando a conversão de celulose e xilose e aumentando o rendimento de etanol a partir da palha de arroz (WANG, H.; KOBAYASHI; MOCHIDZUKI, 2015).

Nesse interim, os resultados encontrados, sugerem que o efeito negativo ocorrido principalmente na mistura de EBEC de macro-basidiomicetos e EBE de *T. reesei* e *A. aculeatus*, pode ter se dado em função da presença de inibidores proteicos ou não, presentes nos extratos brutos. O mesmo não foi observado na combinação com EC.

Ao comparar a eficiência do EBE sem liofilizar e o EBE 1X, observou-se que o procedimento de liofilização não comprometeu o sinergismo dos EBEs dos macro-basidiomicetos na combinação com as enzimas *Celluclast* e *Novozymes-188* levando a rendimentos próximos aos obtidos anteriormente.

A otimização de processos quanto a formulação do coquetel ou momento de adição de cada tipo de EBE, respeitando as melhores condições de catálise de cada tipo de enzima lignocelulolítica, pode ser uma alternativa para estabelecer parâmetros de uso dos diferentes tipos de combinações. Investigações de diferentes concentrações de EBEs dos macro-basidiomicetos (FPB-04 e FPB-28) adicionados a biomassas previamente pré-tratadas em diferentes temperaturas, agitação e surfactantes, podem ser variáveis para otimização do processo de hidrólise enzimática de biomassa vegetal, na tentativa de responder se a combinação dos EBEs e enzimas comerciais pode ser desde o início ou após adição em diferentes tempos de hidrólise.

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho indicaram que resíduos lignocelulósicos provenientes da agroindústria do óleo de palma, podem ser usados na suplementação de meios de cultura sólidos (ágar enriquecido) para cultivo de macro-basidiomicetos em placas, e também, como substrato de cultivos no sistema FES para estes fungos. Além disso, os macro-basidiomicetos quando crescidos na biomassa do cacho vazio de dendê, possibilitam a extração de um *pool* enzimático, contendo enzimas lignocelulolíticas além de proteases e fitases.

Estas enzimas apresentam efeitos sinérgicos em combinações com extratos de outros fungos filamentosos. Os fungos que reuniram as melhores características nas condições avaliadas foram *Fomes fasciatus* FPB-28 e *Flavodon flavus* FPB-04, ambos apresentaram bons índices de crescimento e vigor micelial (visual) *in vitro* e em sistema FES, além de produzirem extratos enzimáticos que combinados com extratos celulolíticos (Tr+Aa) e (EC), aumentaram o rendimento de glicose em 18,8% e 14,7%, respectivamente, na hidrólise do CVD-AH.

Dessa forma, os objetivos específicos OE1, OE2 e OE3 foram alcançados. Adicionalmente, estudos posteriores poderão investigar processos de otimização para melhoria na produção e eficiência do EBE.

REFERÊNCIAS

- ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **Laboratory analytical procedure**, v. 6, n. 465, p. 1996, 1996.
- AN, Q. et al. Sequential solid-state and submerged cultivation of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* on biomass and the activity of lignocellulolytic enzymes. **BioResources**, v. 11, n. 4, p. 8791-8805, 2016.
- ANDRIĆ, P. et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 3, p. 308-324, 2010.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of radiation research and applied sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.
- ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 3110-3116, 1992.
- BABA, Y. et al. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma* cellulase system. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 3, 2015.
- BILAL, M. et al. Delignification and fruit juice clarification properties of alginate-chitosan-immobilized ligninolytic cocktail. **LWT**, v. 80, p. 348-354, 2017.
- CARDOSO, W. S. et al. Minimum cocktail of cellulolytic multi-enzyme complexes obtained from white rot fungi via solid-state fermentation. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 46, 2018.
- CHYLENSKI, P. et al. Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. **Journal of biotechnology**, v. 246, p. 16-23, 2017.
- COBAN, H. B.; DEMIRCI, A.; TURHAN, I. Microparticle-enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production and evaluation of fungal morphology in submerged fermentation. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 6, p. 1075-1080, 2015.
- COLLOPY, P. D.; ROYSE, D. J. Characterization of phytase activity from cultivated edible mushrooms and their production substrates. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 25, p. 7518-7524, 2004.
- CUNHA, F. et al. On-site production of enzymatic cocktails using a non-conventional fermentation method with agro-industrial residues as renewable feedstocks. **Waste and biomass valorization**, v. 8, n. 2, p. 517-526, 2017.

DA SILVA MACHADO, A.; FERRAZ, A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. **Bioresource technology**, v. 225, p. 17-22, 2017.

DAI, Y. et al. Combination of biological pretreatment with NaOH/Urea pretreatment at cold temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource technology**, v. 198, p. 725-731, 2015.

DE LA TORRE, I. et al. Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. **Bioresource technology**, v. 245, p. 906-915, 2017.

DE SOUZA, M. F.; DA SILVA BON, E. P.; DA SILVA, A. S. A. On-site integrated production of cellulases and β -glucosidases by *Trichoderma reesei* Rut C30 using steam pretreated sugarcane bagasse. **bioRxiv**, p. 461012, 2018.

DEVI, M. C.; KUMAR, M. S. Production, optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 1, p. 120-128, 2017.

EDIVALDO FILHO, X.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo- β -1, 4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of industrial microbiology**, v. 11, n. 3, p. 171-180, 1993.

EIBINGER, M. et al. Surface structural dynamics of enzymatic cellulose degradation, revealed by combined kinetic and atomic force microscopy studies. **The FEBS journal**, v. 281, n. 1, p. 275-290, 2014.

ELISASHVILI, V. et al. Evaluation and regulation of the lignocellulolytic activity of novel white-rot basidiomycetes. **Global Journal of Biochemistry | Volume**, v. 2, n. 2, 2011.

ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 273-277, 2017.

FARACO, V. et al. A new subfamily of fungal subtilases: structural and functional analysis of a *Pleurotus ostreatus* member. **Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 457-466, 2005.

FILLAT, Ú. et al. Laccases as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: a review. **Fermentation**, v. 3, n. 2, p. 17, 2017.

FLORENCIO, C. et al. Validation of a novel sequential cultivation method for the production of enzymatic cocktails from *Trichoderma* strains. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1389-1402, 2015.

FLOUDAS, D. et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1715-1719, 2012.

FONSECA, T.; BARRONCAS, J.; TEIXEIRA, M. Production in solid matrix and partial characterization of proteases of edible mushroom in the Amazon rainforest. **Rev. Bras. Tecnol. Ind.**, v. 8, p. 1227-1236, 2014.

GARCÍA-TORREIRO, M. et al. Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 486-492, 2016.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GONTIA-MISHRA, I.; TIWARI, S. Molecular characterization and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 313, 2013.

GONZÁLEZ-BAUTISTA, E. et al. Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. **Fuel**, v. 196, p. 32-35, 2017.

GOUD, M. J. P. et al. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. **Afr. J. Biotechnol**, v. 8, n. 3, p. 354-360, 2009.

GULATI, H.; CHADHA, B.; SAINI, H. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 91-98, 2007.

GUPTA, V. K. et al. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.

HARLAND, B. F.; MORRIS, E. R. Phytate: a good or a bad food component? **Nutrition Research**, v. 15, n. 5, p. 733-754, 1995.

HASSAN, A. A. K.; ABDEL-JUBOURI, H. A. Production, Purification and Characterization of Phytase from Fruit Bodies of local isolate of the basidiomycetes fungus and test its impact on Some biological *Pleurotus ostreatus* (11L) variables in Albino Rats. **Global Proceedings Repository**, p. 613 - 648, 2018.

HEINZKILL, M. et al. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1601-1606, 1998.

HIYAMA, R.; GISUSI, S.; HARADA, A. Evaluation of waste mushroom medium from cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) as feedstock of enzymic saccharification. **Journal of wood science**, v. 57, n. 5, p. 429-435, 2011.

HOA, H. T.; WANG, C.-L. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). **Mycobiology**, v. 43, n. 1, p. 14-23, 2015.

IMRAN, M. et al. Production and characterization of commercial cellulase produced through *Aspergillus niger* IMMIS1 after screening fungal species. **Pak J Bot**, v. 50, n. 4, p. 1563-1570, 2018.

INÁCIO, F. D. et al. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

INÁCIO, F. D. et al. Biodegradation of human keratin by protease from the basidiomycete *Pleurotus pulmonarius*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 124-129, 2018.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

KASSON, M. T. et al. Mutualism with aggressive wood-degrading *Flavodon ambrosius* (Polyporales) facilitates niche expansion and communal social structure in *Ambrosiophilus ambrosia* beetles. **Fungal ecology**, v. 23, p. 86-96, 2016.

KAWAGUCHI, T. et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. **Gene**, v. 173, n. 2, p. 287-288, 1996.

KESHAVARZ, B.; KHALESİ, M. *Trichoderma reesei*, a superior cellulase source for industrial applications. **Biofuels**, v. 7, n. 6, p. 713-721, 2016.

KHOKHAR, I. et al. Isolation and screening of highly cellulolytic filamentous fungi. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 16, n. 3, 2012.

KLEIN- MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, 2012.

KOBAKHIDZE, A. et al. Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. **Annals of Agrarian Science**, v. 14, n. 3, p. 169-176, 2016.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International journal of food science & technology**, v. 37, n. 7, p. 791-812, 2002.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249-272, 2016.

KUN, R. S. et al. Developments and opportunities in fungal strain engineering for the production of novel enzymes and enzyme cocktails for plant biomass degradation. **Biotechnology Advances**, 2019.

LAI, T. T. et al. Production of *Trichoderma reesei* RUT C-30 lignocellulolytic enzymes using paper sludge as fermentation substrate: an approach for on-site manufacturing of enzymes for biorefineries. **Waste and biomass valorization**, v. 8, n. 4, p. 1081-1088, 2017.

LASSEN, S. F. et al. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a

- Flavodon flavus, and Trametes pubescens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 10, p. 4701-4707, 2001.
- LEE, J.-W. et al. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. **The Journal of Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 485-491, 2007.
- LOPES, A.; FERREIRA FILHO, E. X.; MOREIRA, L. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 3, p. 632-645, 2018.
- MACHADO, A. R. G. et al. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi journal of biological sciences**, v. 23, n. 5, p. 621-627, 2016.
- MANDELS, M.; WEBER, J. Cellulases and their applications. **Advances in chemistry series**, v. 95, p. 391, 1969.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, J. C. et al. Application of a combined fungal and diluted acid pretreatment on olive tree biomass. **Industrial crops and products**, v. 121, p. 10-17, 2018.
- MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 597-609, 2015.
- METREVELI, E. et al. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune*. **Bioresource technology**, v. 241, p. 652-660, 2017.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. B. et al. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. **Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 245-252, 1997.
- MORRISON, J. M.; ELSHAHED, M. S.; YOUSSEF, N. H. Defined enzyme cocktail from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A effectively releases sugars from pretreated corn stover and switchgrass. **Scientific reports**, v. 6, p. 29217, 2016.
- MUTHUKRISHNAN, S. Optimization and Production of Industrial Important Cellulase Enzyme from *Penicillium citrinum* in Western Ghats of Sathuragiri Hills Soil Sample Isolate. **Univers. J. Microbiol. Res.**, v. 5, n. 1, p. 7-16, 2017.
- NARAIAN, R.; SINGH, M. Improved yield of ligno-cellulolytic enzymes on oyster shell powder added typha weed substrate by *Pleurotus florida*. **Cell Mol Biol**, v. 62, p. 143-158, 2016.
- OLIVA-TARAVILLA, A. et al. Optimization of the laccase detoxification step in hybrid hydrolysis and fermentation processes from wheat straw by *K. marxianus* CECT 10875. **Bioethanol**, v. 2, n. 1, p. 126-133, 2016.

- PELÁEZ, R. D. R. **Enzimas lignocelulolíticas de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais oriundas da agroindústria do dendê e obtenção de açúcares fermentescíveis**. 2017. 145f Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - PPGB, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi - TO.
- PERALTA, R. M. et al. Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. In: (Ed.). **Biotechnology of microbial enzymes**: Elsevier, 2017. p.119-149.
- PETRIDIS, Loukas; SCHULZ, Roland; SMITH, Jeremy C. Simulation analysis of the temperature dependence of lignin structure and dynamics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 50, p. 20277-20287, 2011.
- PREMKUMAR, G. et al. Cellulase and Xylanase Production by *Pleurotus* sp. on Mixed Substrate System. **J Biotechnol Biomater**, v. 8, n. 283, p. 2, 2018.
- QIN, Y. et al. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. **Protein expression and purification**, v. 58, n. 1, p. 162-167, 2008.
- RAJ, K.; KRISHNAN, C. Improved high solid loading enzymatic hydrolysis of low-temperature aqueous ammonia soaked sugarcane bagasse using laccase-mediator system and high concentration ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 32-40, 2019.
- RAMOS, L. P. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource technology**, v. 175, p. 195-202, 2015.
- ROUCHES, E. et al. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179-198, 2016.
- RYTIOJA, J. et al. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.
- SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with *Phlebia brevispora* NRRL- 13108 for enhanced enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 2, p. 365-374, 2017.
- SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.
- SAINI, J. K. et al. Improvement of wheat straw hydrolysis by cellulolytic blends of two *Penicillium* spp. **Renewable energy**, v. 98, p. 43-50, 2016.
- SALMON, D. N. et al. Formulated products containing a new phytase from *Schizophyllum* sp. phytase for application in feed and food processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1069-1074, 2011.

SALVACHÚA, D. et al. Sugar recoveries from wheat straw following treatments with the fungus *Irpex lacteus*. **Bioresource technology**, v. 131, p. 218-225, 2013.

SHAH, S. R. et al. Optimization of the enzymatic saccharification process of empty fruit bunch pretreated with laccase enzyme. **Bioresources**, v. 11, n. 2, p. 5138-5154, 2016.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-17, 2017.

SHIRKAVAND, E. et al. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment—A review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 54, p. 217-234, 2016.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGHAL, P.; NIGAM, V.; VIDYARTHI, A. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 3, n. 3, p. 653-669, 2012.

SINSABAUGH, R. L.; CARREIRO, M. M.; ALVAREZ, S. Enzyme and microbial dynamics of litter decomposition. **Enzymes in the Environment, Activity, Ecology, and Applications**. Marcel Dekker, New York, Basel, p. 249-265, 2002.

SKYBA, O. et al. Gene expression patterns of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* are influenced by wood substrate composition during degradation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 82, n. 14, p. 4387-4400, 2016.

SMITH, P. E. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SRIVASTAVA, N. et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211, 2006.

THIRIBHUVANAMALA, G. et al. Induction of lignolytic enzyme activities in different agro residues by the white rot fungi, *Pleurotus sajjar-caju*. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, p. 89-94, 2017.

THOMSEN, S. T. et al. Combination of ensiling and fungal delignification as effective wheat straw pretreatment. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 16, 2016.

TIAN, X. F.; FANG, Z.; GUO, F. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 335-350, 2012.

- VALADARES, F. et al. Exploring glycoside hydrolases and accessory proteins from wood decay fungi to enhance sugarcane bagasse saccharification. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 110, 2016.
- WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. **Fungi: biology and applications**, p. 1-35, 2017.
- WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1447-1457, 2012.
- WANG, H.; KOBAYASHI, S.; MOCHIDZUKI, K. Effect of non-enzymatic proteins on enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of different lignocellulosic materials. **Bioresource technology**, v. 190, p. 373-380, 2015.
- WANG, W.; KANG, L.; LEE, Y. Y. Production of cellulase from kraft paper mill sludge by *Trichoderma reesei* rut C-30. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 382-394, 2010.
- WANG, Y. et al. Synergistic action between extracellular products from white-rot fungus and cellulase significantly improves enzymatic hydrolysis. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 178-185, 2018.
- WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 4, p. 491-499, 2005.
- WOJTUSIK, M. et al. Study of the enzymatic activity inhibition on the saccharification of acid pretreated corn stover. **Biomass and bioenergy**, v. 98, p. 1-7, 2017.
- WOLFENDEN, B. S.; WILLSON, R. L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 7, p. 805-812, 1982.
- WOOLRIDGE, E. Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass. **Catalysts**, v. 4, n. 1, p. 1-35, 2014.
- YULIANA, T. et al. Potential of basidiomycetes *Marasmiellus* sp. and *Ganoderma lucidum* in xylanase enzyme production and its activity using agroindustry waste. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019. IOP Publishing. p.012078.
- ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 27, p. 38-45, 2014.
- ZHANG, W. et al. Improved treatment and utilization of rice straw by *Coprinopsis cinerea*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, n. 2, p. 616-629, 2018.
- ZHAO, X.-Q. et al. Metabolic Engineering of Fungal Strains for Efficient Production of Cellulolytic Enzymes. In: (Ed.). **Fungal Cellulolytic Enzymes**: Springer, 2018. p.27-41.

ZHU, N. et al. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 42, 2016.

**CAPÍTULO 3 – Caracterização do cacho vazio de dendê após pré-tratamento
biológico com macro-basidiomicetos**

RESUMO

A utilização de macro-basidiomicetos (inglês, *White-rot fungi* ou *WRF*) no pré-tratamento biológico de biomassas lignocelulósicas pode ser uma alternativa ambientalmente correta e de baixo custo quando comparado com outros tipos de pré-tratamento (físico, químico, físico-químico). Contudo, o pré-tratamento com fungos pode resultar na perda de carboidratos como a celulose, em função do metabolismo microbiano. Assim, linhagens fúngicas que apresentam maior degradação de lignina em relação a holocelulose (celulose e hemicelulose) são desejáveis. Neste trabalho, oito (8) linhagens de fungos isolados do cerrado brasileiro e ou adquiridos em feiras, foram utilizadas como agentes produtores de enzimas desconstrutoras de parede celular vegetal (pré-tratamento biológico) – cultivados por fermentação estado sólido (FES) – utilizando cachos vazios de dendê como substrato de cultivo. A biomassa vegetal com biomassa fúngica BVBF, foi caracterizada em relação aos componentes estruturais (celulose, hemicelulose, lignina e extrativos), a fim de verificar a influência dos pré-tratamentos biológicos sobre estes componentes. Além disso, o material foi submetido a uma sacarificação enzimática para avaliação da digestibilidade. Os resultados indicaram que *Flavodon flavus* FPB-04 foi a linhagem mais seletiva (SLC = 2,96) seguido de FPB-26 (nd) (1,64) e *Fomes fasciatus* FPB-28 (1,01). As linhagens *Trametes* sp. FPB-115 e *Pycnoporus* sp. FPB-116 demonstraram maior consumo de celulose do cacho de dendê. A sacarificação também foi melhorada pelo pré-tratamento com *Flavodon flavus* FPB-04 levando ao rendimento de 15% de glicose. Uma simulação da hidrólise com adição de compostos fenólicos, evidenciou efeito sinérgico das combinações de EBE (macro-basidiomicetos e ascomicetos), principalmente *Fomes fasciatus* FPB-28 na redução de algumas dessas substâncias, que podem ser inibidores de enzimas ou microrganismos no processo de obtenção de etanol celulósico.

Palavras-chave: Pré-tratamento biológico. Deslignificação. Inibidores

ABSTRACT

The use of macro-basidiomycetes (White-rot fungi or WRF) in the biological pretreatment of lignocellulosic biomasses can be an environmentally correct and low-cost alternative when compared to other types of pretreatment (physical, chemical, and physical-chemical). However, pre-treatment with fungi may result in the loss of carbohydrates such as cellulose as a function of microbial metabolism. Thus, fungal strains that present higher degradation of lignin in relation to holocellulose (cellulose and hemicellulose) are desirable. In this work, eight (8) strains of fungi isolated from Brazilian cerrado and or purchased at fairs were used as agents producing deconstructive enzymes of the plant cell wall (biological pretreatment) - grown by solid-state fermentation (FES) - using empty fruit bunches as a substrate for cultivation. The biomass with fungal biomass BVBF was characterized in relation to the structural components (cellulose, hemicellulose, lignin, and extractives), in order to verify the influence of the biological pre-treatments on these components. In addition, the material was submitted to enzymatic saccharification to evaluate the digestibility. The results indicated that *Flavodon flavus* FPB-04 was the most selective strain (SLC = 2.96) followed by FPB-26 (nd) (1.64) and *Fomes fasciatus* FPB-28 (1.01). The *Trametes* sp. FPB-115 and *Pycnoporus* sp. FPB-116 showed a higher consumption of cellulose of palm oil. Saccharification was also improved by pre-treatment with *Flavodon flavus* FPB-04 leading to 15% glucose yield. A simulation of the hydrolysis with the addition of phenolic compounds showed a synergistic effect of the combinations of EBE (macro-basidiomycetes and ascomycetes), mainly *Fomes fasciatus* FPB-28 in the reduction of some of these substances, which may be enzymatic inhibitors or fermentation in the process of obtaining cellulosic ethanol.

Keywords: Biological pre-treatment. Delignification. Inhibitors

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada, em biorrefinarias, como matéria-prima para conversão dos polissacarídeos celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis ou químicos de valor agregado (DE JONG; JUNGMEIER, 2015; MANDL, 2010). Apesar disso, a biomassa apresenta como limitação a presença da lignina, que confere alta recalcitrância dificultando, por conseguinte a hidrólise enzimática (PETTOLINO et al., 2012).

Dessa forma, métodos de pré-tratamento da biomassa como físicos, térmicos, químicos, biológicos e combinados são indispensáveis a fim de romper as estruturas e facilitar as etapas subsequentes (KARIMI; SHAFIEI; KUMAR, 2013; NEVES; PITARELO; RAMOS, 2016; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Todos apresentam vantagens e desvantagens, contudo, químicos e físicos que empregam altas temperaturas, além de poluentes, acabam levando a formação de inibidores para as operações unitárias de hidrólise e fermentação (RASMUSSEN, HELENA; SØRENSEN; MEYER, 2014).

Diante disso, o emprego de pré-tratamentos biológicos empregando-se principalmente os macro-basidiomicetos, tem sido apresentado como alternativa promissora uma vez que estes fungos são produtores de enzimas capazes de modificar a lignina (DA SILVA MACHADO; FERRAZ, 2017; SAHA et al., 2016) e biodetoxificar o efeito de inibidores oriundos de outros processos de pré-tratamento (MORENO et al., 2015).

O emprego de pré-tratamentos biológicos, contudo, requer organismos com habilidade de melhorar a digestibilidade da biomassa e além disso, ser capaz de agir seletivamente sobre a lignina preservando ao máximo os polissacarídeos celulose e hemicelulose (HERMOSILLA et al., 2018; SALVACHÚA et al., 2011).

Neste interim, a indústria de óleo de palma se enquadraria como modelo de biorrefinaria por gerar anualmente milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos, entre eles, o cacho vazio de dendê (CVD) que representa 20% do peso do cacho com frutos frescos. Trata-se, portanto, de uma abundante biomassa cujo descarte indevido pode acarretar em danos ambientais (LEE; OFORI-BOATENG, 2013).

Com base no exposto, o objetivo deste capítulo foi avaliar o pré-tratamento biológico de oito (8) linhagens de macro-basidiomicetos em sistema FES utilizando CVD como substrato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pré-tratamento e caracterização das biomassas lignocelulósicas

As oito linhagens de macro-basidiomicetos, foram cultivadas nas mesmas condições descritas no capítulo 2 durante quinze dias, período em que houve completa colonização do substrato lignocelulósico. As biomassas lignocelulósicas após total colonização foram consideradas como biomassas pré-tratadas biologicamente pelos macro-basidiomicetos (CVD-PB). Assim, os componentes estruturais da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) foram parcialmente desconstruídos em função do metabolismo microbiano. Desta forma, a biomassa a partir de então passa-se a ser uma mistura de biomassa vegetal (desconstruída parcialmente) juntamente com a massa microbiana (micélio fúngico/metabólitos), aqui denominada de BVBF. A BVBF foi liofilizada durante 48 horas e triturada (partícula de aproximadamente 2 mm) em moinho de bancada (IKA 11[®]). As amostras de BVBF referente a cada macro-basidiomiceto e a fibra do cacho de dendê *in natura* (sem fungo), tiveram as porcentagens de perdas de massa, no decorrer do processo de pré-tratamento, calculadas de acordo com a equação 3:

$$\% \text{ de perda} = \frac{100 \times (BV_i - BVBF_L)}{BV_i} \quad (3)$$

Onde,

BV_i: Biomassa vegetal inicial sem o fungo.

BVBF_L: Biomassa vegetal com biomassa fúngica liofilizada.

Amostras de BVBF de cada macro-basidiomiceto, o CVD e BD *in natura* (sem o fungo) e o CVD-AH, também foram caracterizadas em relação aos teores de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas no laboratório de química de biomassas e biocombustíveis da Embrapa Agroenergia (LQB), conforme procedimentos recomendados pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (*National Renewable Energy Laboratory* - NREL, Golden, CO, USA) (SLUITER, A; HAMES, B; et al., 2008; SLUITER, AMIE et al., 2008; SLUITER, A; RUIZ, R; et al., 2008).

O coeficiente de absorvidade molar da lignina dos substratos lignocelulósicos (CVD, BD, BVBF e CVD-AH), foi determinado no laboratório de química de biomassas e biocombustíveis – LQB da Embrapa Agroenergia (2,2146 L.g⁻¹ cm⁻¹ em 320 nm).

2.2 Sacarificação das BVBFs com enzima comercial

A sacarificação por meio da hidrólise enzimática das BVBFs foi realizada utilizando enzima a comercial *Cellic[®] CTec3[®]* (Novozymes). Os ensaios foram preparados em tubos tipo *ependorf* de 2 mL com massas de BVBF com extrativos (amostras sem lavar) e livres de extrativos (BVBF submetidos a uma extração acelerada por solventes água/etanol) (Dionex™ ASE™ *Termo Fisher Scientific* -Waltham, MA, EUA) (teor de sólidos de 5%). A cada tubo foi adicionado 1,40 mL da enzima (15 FPU.g⁻¹) diluída em tampão citrato de sódio e ácido cítrico 0,1 M pH 5,0; os tubos foram selados com *parafilm* “M” *Kasvi[®]* e na sequência acondicionados em termobloco (*Eppendorf ThermoMixer[®]* C) a 50 °C e 800 rpm durante 24 horas. Ao final da hidrólise enzimática, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm 4 °C durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, diluídos em *vials* de 1,5 mL para quantificação de glicose e xilose, por HPLC. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os rendimentos da sacarificação das hidrólises realizadas foram calculados conforme descrito no capítulo (2) anterior.

2.3 Combinações de pré-tratamentos biológico e hidrotérmico

CVD triturados (80 mesh), foram utilizados nos pré-tratamentos biológico (BIO), biológico + hidrotérmico (BioAH), hidrotérmico (AH) e sem pré-tratamento (CST). Os tratamentos foram realizados da seguinte maneira:

Biológico (BIO): Cultivo de *Flavodon flavus* FPB-04 em sistema FES utilizando 10 g de CV em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL durante 15 dias a 28 °C e 65% (±5) de umidade.

Biológico + hidrotérmico (BioAH): ao final do cultivo de *F. flavus* no sistema FES, a biomassa (BVBF) foi submetida ao pré-tratamento hidrotérmico (autohidrólise) com adição de água de torneira na proporção de 1:10 m/v. O pré-tratamento ocorreu a 180°C 600 rpm de agitação durante 40 minutos em reator de alta/baixa pressão (4520 - *Parr Instruments Company*, Moline, Illinois EUA).

Hidrotérmico (AH): Cacho sem fungo pré-tratado por autohidrólise, nas mesmas condições do BioAH.

Sem pré-tratar (CST): CVD triturado sem nenhum processo de tratamento.

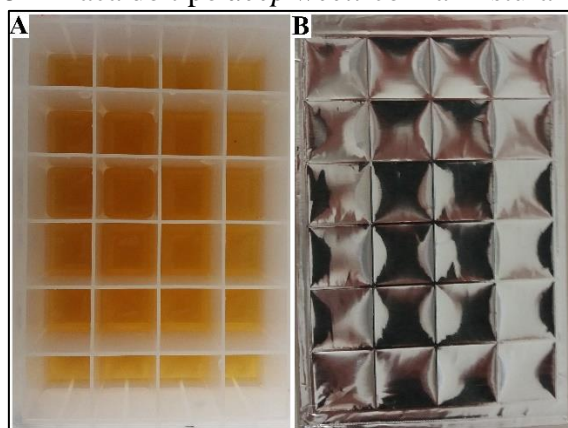
As hidrólises enzimáticas (HE) das biomassas descritas anteriormente, foram realizadas em placas de 24 poços, tipo *deep well*. Onde foram pesadas massas das biomassas pré-tratadas e não pré-tratadas nas células da placa, de modo a garantir uma carga de sólidos de 5% (calculado com base na matéria seca), juntamente com um volume final de 2,6 mL da mistura enzimática (Tr+Aa) ou [FPB-04 + (Tr+Aa)] ou [FPB-28 + (Tr+Aa)] ou a enzima comercial *Celic CTec3* (15 FPU g⁻¹). Os açúcares (glicose e xilose) foram quantificados por HPLC. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4 Avaliação de EBEs de macro-basidiomicetos e ascomicetos na remoção de compostos fenólicos e inibidores

Foi realizada uma simulação das hidrólises realizadas durante o trabalho, a fim de verificar a atuação dos EBEs de macro-basidiomicetos sozinhos e ou combinados com os EBEs dos fungos *T. reesei* e *A. aculeatus*, quando em contato com substâncias relacionadas como inibitórias da fermentação ou sacarificação.

A simulação ocorreu sem a presença da biomassa lignocelulósica e as demais condições foram mantidas. Foram realizados *mix* com padrões das substâncias químicas [ácido gálico, ácido vanílico, hidroximetilfurfural (HMF), furfural, vanilina, ácido cumárico, siringaldeído, ácido ferúlico e ácido sinápico] (Sigma-Aldrich) para uma concentração final de 1 g.L⁻¹ e então misturados a tampão citrato de sódio / ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 e EBEs (FIGURA 35 A).

Figura 35 – Placa do tipo *deep well* com a mistura reacional.



Fonte: Do autor (2019).

As placas foram seladas e incubadas a 50 °C em shaker de bancada a 200 rpm durante 180 minutos (FIGURA 35 B). Decorrido o tempo de incubação, alíquotas de 1 mL foram retiradas e congeladas para quantificação, por cromatografia.

Para quantificação de ácido láctico, ácido succínico, ácido levulínico, ácido acético e ácido fórmico, as condições cromatográficas foram as seguintes: Utilizando o detector por índice de refração (RID), empregou-se coluna Aminex HPX-87H com pré-coluna, volume de injeção de 10 µL; a fase móvel composta por solução de ácido sulfúrico 5 mM; fluxo de 0,6 mL/minuto; temperatura da coluna a 45 °C e temperatura do detector a 45°C.

Para quantificação de ácido gálico, ácido vanílico, HMF, furfural e vanilina, usando detector de arranjo de diodos DAD empregou-se coluna Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm 2.1x150 mm com pré coluna; detecção a 280 nm e em 320 nm (ácido cumárico, siringaldeído, ácido ferúlico e ácido sinápico), o volume de injeção foi de 1 µL; fase móvel: A= ácido fórmico 0.1%, B= acetonitrila; empregando-se o seguinte gradiente: 0 min (90% de A e 10% de B), 5 min (80% de A e 20% de B), 7.5 min (75% de A e 25% de B) e 12.5 min (55% de A e 45% de B); o fluxo de trabalho foi de 0,4 mL/minuto e temperatura da coluna a 40°C.

Foram obtidas as porcentagens de redução com base nos controles realizados (Padrões das substâncias sem EBEs). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição dos resíduos lignocelulósicos da dendecultura

O material lignocelulósico *in natura* e pré-tratado utilizado no trabalho (capítulos 2 e 3) foi avaliado quanto sua composição em relação aos carboidratos estruturais, lignina e extrativos (TABELA 6). Em valores absolutos, o CVD apresenta maior quantidade de polissacarídeos se comparado com a borra do decantador de óleo e, a lignina, representa uma fração considerável em ambos os resíduos, principalmente, no CVD-AH.

O CVD é uma biomassa promissora para obtenção de açúcares fermentescíveis, no entanto, sem a utilização de pré-tratamento os rendimentos de açúcares redutores são limitados (0,4 a 2,6%). A presença de lignina e celulose nesse material, foram atribuídas à redução na obtenção de açúcar (YING et al., 2014; ZULKIPLE; MASKAT; HASSAN, 2016). Corroborando com isso, observamos que o pré-tratamento hidrotérmico hidrolisou majoritariamente a hemicelulose do CVD nas condições empregadas. Em relação a lignina, conforme discutido no capítulo anterior, os tratamentos utilizados tanto no processo industrial de obtenção do óleo como o empregado no presente estudo (hidrotérmico), podem ter contribuído para colapsar a lignina do CVD.

Tabela 5 – Composição química de alguns dos resíduos da dendecultura.

Material	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Extrativos (%)
CVD <i>in natura</i>	27,69	31,15	16,37	14,91
BD <i>in natura</i>	25,74	18,22	12,39	21,38
CVD-AH	42,10	38,59	8,75	Não se aplica

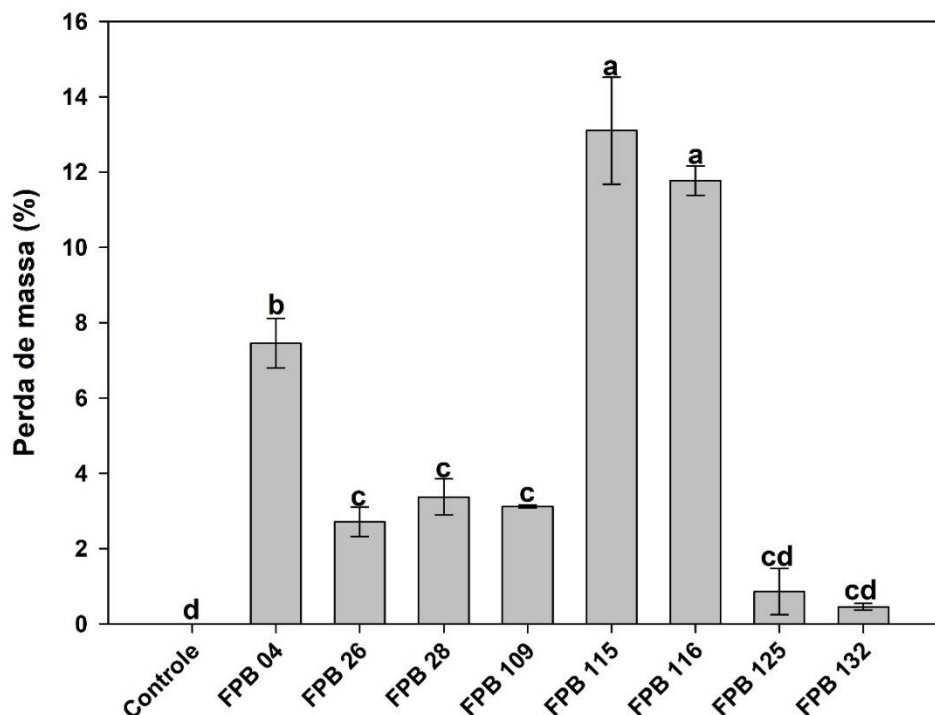
Fonte: Do autor (2019)

3.2 Perdas de massa final dos componentes vegetais – metabolismo microbiano

A biomassa do CVD foi pré-tratada biologicamente por oito (08) diferentes espécies de macro-basidiomicetos, que por sua vez metabolizaram parte da celulose, hemicelulose e lignina como fonte de carbono e nitrogênio. As BVBFs obtidas após 15 dias de FES-1 (modificado), apresentaram perda de massa (FIGURA 36). Tais perdas são esperadas, uma vez que fungo converte parte das fontes de carbono/nitrogênio presentes nas biomassas vegetais em biomassa fúngica (micélio), ou seja, perda pela respiração celular, liberando CO₂ e água. As maiores perdas de massa observadas foram de 13,10 ±

2,45 % para biomassa pré-tratada por *Trametes* sp. FPB-115 e $11,78 \pm 0,67$ % para *Pycnoporus* sp. FPB-116; sendo seguidos por *Flavodon flavus* FPB-04 ($7,46 \pm 1,14$ %).

Figura 36 – Perdas de massa (%) da BVBF após pré-tratamento biológico com 08 linhagens de macro-basidiomicetos.



Legenda: Cultivo em sistema FES durante 15 dias a 28°C e 65% (± 5) de umidade. Os dados apresentados representam a média e o erro padrão de experimento realizado em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

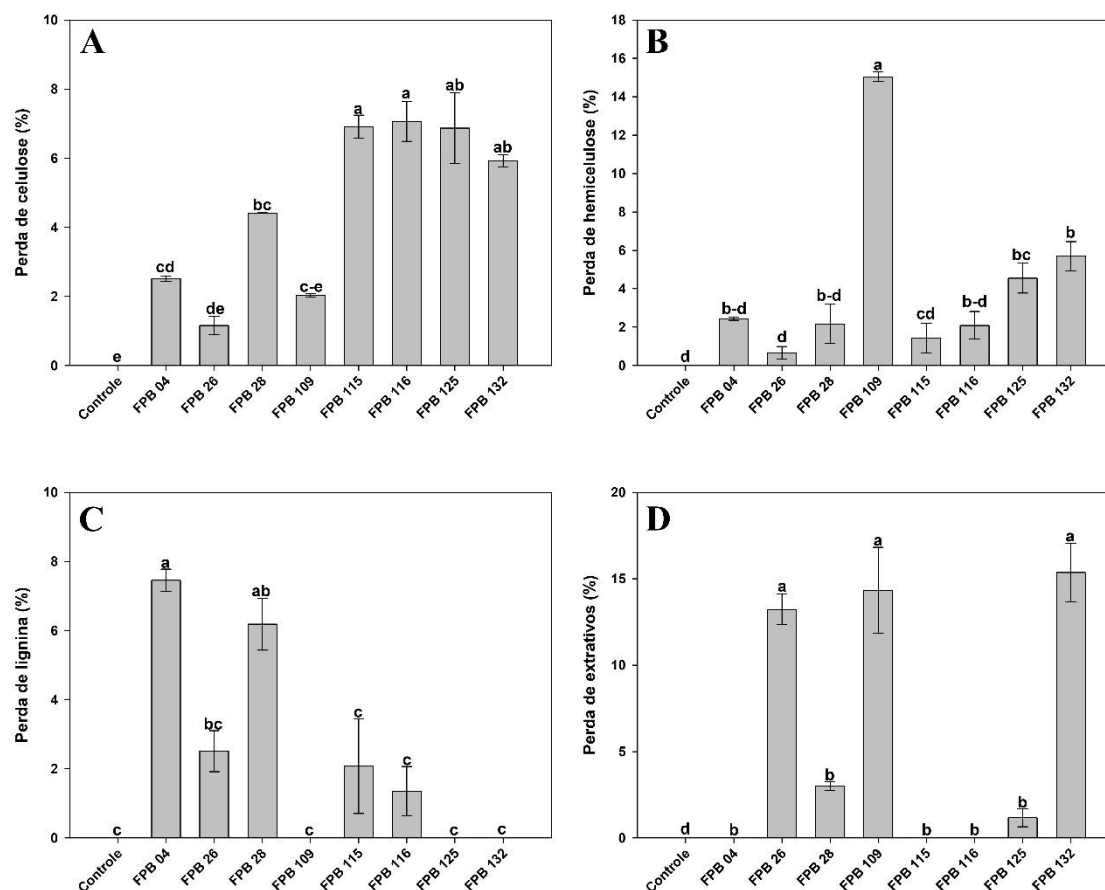
3.3 Perdas de componentes (celulose, hemicelulose e lignina) das BVBFs

As perdas de componentes estruturais do cacho pré-tratado pelas 8 linhagens de fungos são mostradas na Figura 37. As maiores perdas de celulose (glucana) ocorreram no cultivo de *Pycnoporus* sp. FPB-116 ($7,06 \pm 0,5$ %) seguido de *Trametes* sp. FPB-115 ($6,9 \pm 0,3$ %), *Coprinus* sp. FPB-125 ($6,87 \pm 1,0$) e *Pleurotus* sp. FPB-132 ($5,92 \pm 0,17$ %) (FIGURA 37 A). Em relação a hemicelulose, as maiores perdas observadas ocorreram para *Pleurotus* sp. FPB-109 ($15,03 \pm 0,2$ %) e *Pleurotus* sp. FPB-132 ($5,6 \pm 0,7$ %) (FIGURA 37 B). A deslignificação foi maior para *F. flavus* FPB-04 ($7,45 \pm 0,3$ %) e *F. fasciatus* FPB-28 ($6,1 \pm 0,7$ %) (FIGURA 37 C).

Os extrativos (ácidos graxos, açúcares simples, ceras e esteróis) presentes na biomassa do cacho vazio de dendê apresentaram redução nas BVBFs, como apresentado

pelas linhagens *Pleurotus* sp. FPB-132 (15,3%), *Pleurotus* sp. FPB-109 (14,3%) e FPB-26 (13,2%) (FIGURA 37 D).

Figura 37 – Perdas (%) de componentes estruturais das BVBFs.



Legenda: Celulose (A) Hemicelulose (B), Lignina (C) e extrativos (D) do cacho após pré-tratamento biológico com oito (8) macro-basidiomicetos em sistema FES [15 dias a 28°C e 65% (± 5) de umidade]. Os dados apresentados representam a média e o erro padrão de experimento realizado em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Fonte: Do autor (2019).

Nas condições de cultivo avaliados neste trabalho (15 dias em cacho vazio de dendê), foi possível observar que as fontes de carbono presentes na holocelulose (celulose e hemicelulose) foram, de modo geral, mais metabolizados que a lignina. Tratamentos biológicos com macro-basidiomicetos durante tempos de cultivo mais longos (30, 45, 60 ou mais dias), podem apresentar resultados de deslignificação mais significativos por parte de algumas espécies (SAHA et al., 2016; SHIRKAVAND et al., 2017), porém, com maiores perdas de holocelulose (carboidratos).

Contudo, neste trabalho o foco foi selecionar macro-basidiomicetos que tenham a capacidade de deslignificação em menor tempo de FES, de maneira que as biomassas

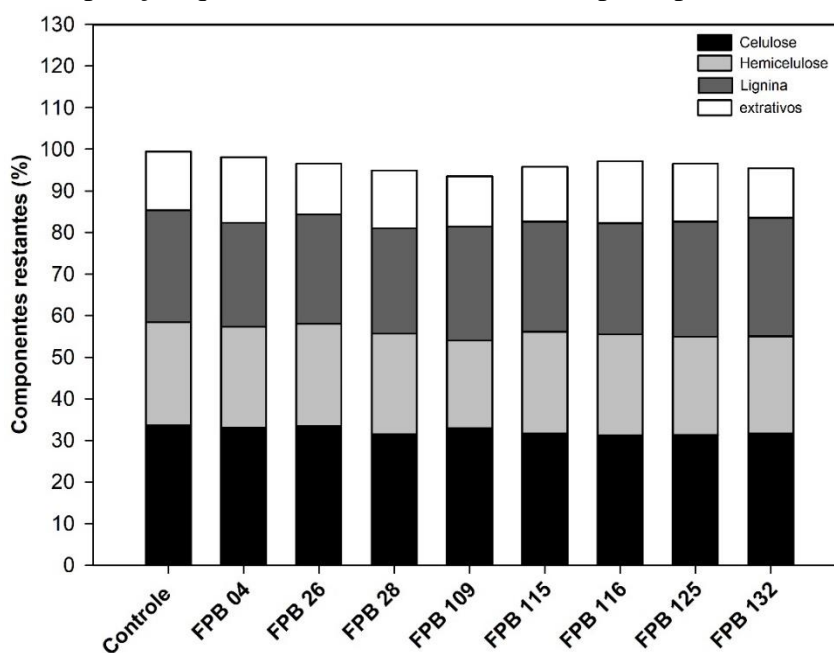
pudessem ser novamente tratadas, para obter mais glicose e menos inibidores enzimáticos ou fermentativos.

A degradação de lignina por macrofungos está relacionada com variações no consumo de açúcares, obtidos a partir da quebra da holocelulose, para o próprio crescimento fúngico (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016). A preferência de alguns fungos pela hemicelulose tem sido atribuída ao seu menor grau de polimerização (MILLATI et al., 2011), no caso do CVD, utilizado no presente estudo, a hemicelulose representa 16,37%, enquanto a celulose (31,15%). Nossos resultados indicaram que as linhagens apresentaram capacidade de degradação simultânea desses polissacarídeos.

3.4 Composições das BVBFs

A composição das biomassas pré-tratadas (BVBFs) está apresentada na Figura 38. Pode-se observar que, na análise de caracterização de biomassa lignocelulósica, obteve-se retorno de um fechamento de massa próximo de 100%.

Figura 38 – Composição química das BVBFs restantes após o pré-tratamento biológico.



Legenda: Composição (celulose, hemicelulose, lignina e extrativos) das BVBFs após o pré-tratamento com os oito (8) macro-basidiomicetos durante 15 dias a 28 °C e 65% (± 5) de umidade. Os dados apresentados são a média de análises realizadas em triplicata.

Fonte: Do autor (2019).

Os macro-basidiomicetos fazem uso de arsenal enzimático para quebrar o polímero de lignina de forma a alterar a estruturação da lignocelulose (SAHA et al., 2016;

SINDHU et al., 2016). A seletividade destes fungos por este polímero é obtida com base na razão entre perda de lignina por perda de celulose (SLC). Dessa forma, os melhores fungos, para aplicação em pré-tratamento biológico, serão aqueles que promovam alta redução de lignina e menor consumo de açúcares (holocelulose ou celulose) em um menor tempo (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016).

A seletividade (“preferência”) do macro-basidiomiceto em degradar mais lignina que celulose (SLC) junto ao CVD biologicamente pré-tratado, foi um dos critérios de seleção do melhor candidato a fornecer biomassa pré-tratada com maior potencial para liberação de açúcares. Nas condições testadas, as espécies que melhor apresentaram esta seletividade foram *Flavodon flavus* FPB-04 (2,96) depois FPB-26 (nd) (2,17) e *Fomes fasciatus* FPB-28 (1,01) enquanto as demais linhagens apresentaram seletividade inferior a 1,0, indicando maior consumo de celulose em relação a lignina contida no cacho vazio de dendê (TABELA 7).

Adicionalmente obteve-se uma segunda seletividade que consistiu na razão entre a perda de lignina por perda de holocelulose (soma dos componentes celulose e hemicelulose) a qual denominou-se de “Seletividade Lignina/Holocelulose – SLH”. Com base nisso, não se obteve diferenças estatisticamente significativas, porém as linhagens mais seletivas (lignina/celulose) apresentaram SLH acima de 1,0 indicando maiores perdas de lignina em relação aos polissacarídeos celulose e hemicelulose (TABELA 7).

Tabela 6 – Perda de componentes do CVD após pré-tratamento biológico com macro-basidiomicetos (BVBF) por 15 dias a 28 °C e 65% (± 5) de umidade, e, seletividade.

Isolado	Perdas (%)*			SLC ¹	SLH ²
	Lignina	Hemicelulose	Celulose		
<i>Flavodon</i> sp. FPB 04	7,45 \pm 0,56 ^a	2,43 \pm 0,12 ^a	2,51 \pm 0,14 ^c	2,96 ^a	1,75 ^a
Nd - FPB 26	2,51 \pm 1,03 ^{bc}	1,16 \pm 0,6 ^a	1,16 \pm 0,26 ^c	2,17 ^{ab}	1,64 ^a
<i>Fomes</i> sp. FPB 28	6,19 \pm 1,31 ^{ab}	2,17 \pm 1,76 ^a	4,41 \pm 0,13 ^b	1,40 ^{bc}	1,01 ^a
<i>Trametes</i> sp. FPB 115	2,07 \pm 2,37 ^{bc}	1,43 \pm 1,36 ^a	6,91 \pm 0,57 ^a	0,24 ^c	0,2 ^a
<i>Pycnoporus</i> sp. FPB 116	1,36 \pm 1,23 ^c	2,09 \pm 1,24 ^a	7,06 \pm 0,98 ^a	0,17 ^c	0,2 ^a

Legenda: Os dados mostrados são a média \pm desvio padrão para experimentos realizados em triplicata. Letras diferentes em sobrescrito na coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹SLC Razão entre perda de lignina e perda de celulose. ²SLH Razão entre perda de lignina e perda de holocelulose (Celulose + Hemicelulose) *Linhagens que apresentaram seletividade negativa foram omitidas da tabela.

Fonte: Do autor (2019).

Existem outros trabalhos envolvendo pré-tratamento biológico de biomassas, encontrando-se diferentes fungos seletivos em relação a lignina. O critério de seletividade de lignina/celulose tem sido amplamente utilizado na seleção de agentes de pré-tratamento biológico de biomassa vegetal. Pois a deslignificação parcial da biomassa é uma etapa importante para obter biomassas pré-tratadas que sejam mais facilmente desconstruídas na etapa de hidrólise enzimática e gerem, então, maiores concentrações de açúcares solúveis, como para minimizar a formação de inibidores enzimáticos e da fermentação, que possam ser oriundos da lignina.

O macro-basidiomiceto *T. versicolor* apresentou SLC de 1,57 após FES durante 14 dias utilizando também o CVD como substrato (KAMCHAROEN et al., 2014). Em outro estudo, agora envolvendo o fungo *Irpex lacteus* Fr.238 617/93 cultivado em resíduos lignocelulósicos (palha de milho, palha de cevada, sabugo de milho e palha de trigo), após 21 dias de colonização as SLCs foram de 1,38, 2,10, 1,54 e 1,40, para cada biomassa testada, respectivamente (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016).

O pré-tratamento biológico da palha de milho (*corn stover*), utilizando 26 macro-basidiomicetos em sistema FES durante 30 dias, evidenciou que a linhagem *Phlebia brevispora* NRRL-13108 foi a mais seletiva SLC (2,46) sendo então selecionada para estudos posteriores (SAHA et al., 2017; SAHA et al., 2016).

Outro trabalho mostrou que o fungo de podridão branca *P. chrysosporium* (ATCC 24725) apresentou SLC de 1,83 durante 15 dias de cultivo no sistema FES, utilizando palha de colza (canola) como substrato (GHASEMZADEH; MOSAVIAN; KARIMI, 2018).

A escolha da espécie de macro-basidiomiceto é de suma importância para o pré-tratamento biológico de biomassas vegetais com finalidade de obtenção de açúcares redutores totais. Porém, outras variáveis experimentais são extremamente importantes, tais como o tipo de biomassa e condições de cultivo (umidade, temperatura e tempo de incubação), que inclusive podem influenciar nos resultados de SLC. Além disso, as espécies empregadas nesses estudos podem exibir comportamento diferenciado devido a expressão diferencial de genes que codificam enzimas lignolíticas e/ou celulolíticas em resposta a diferenças nessas condições (WAN; LI, 2012).

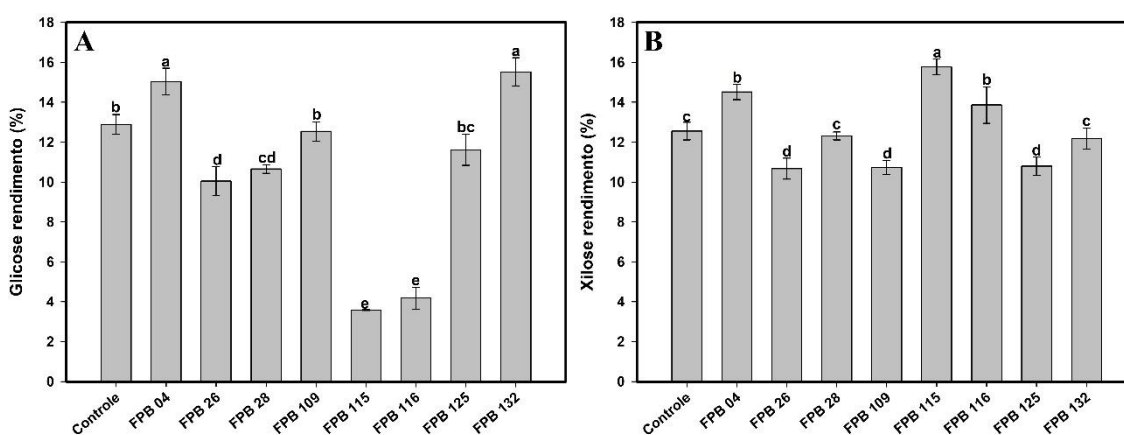
3.5 Sacarificação das BVBFs

Para avaliar o efeito do pré-tratamento do CVD pelos macro-basidiomicetos, as BVBFs foram submetidas a processo de hidrólise enzimática.

Os resultados da sacarificação enzimática das BVBFs (com extrativos) utilizando a enzima *Cellic CTec3*[®] (15 FPU g⁻¹) são apresentados na Figura 39. O tempo de 24 horas de hidrólise enzimática foi escolhido como critério de avaliação para observação quanto a liberação de glicose e xilose das biomassas vegetais pré-tratadas com os macro-basidiomicetos. Nas condições experimentais estabelecidas, a liberação de açúcares das BVBFs diferiu-se de forma significativa em relação às espécies de fungos utilizadas.

Os rendimentos máximos de glicose ocorreram para os macro-basidiomicetos *Pleurotus* sp. FPB-132 (15,5 ± 0,7%) e *Flavodon flavus* FPB-04 (15,03 ± 0,6%) (FIGURA 39 A). Em relação a xilose, o maior rendimento ocorreu para *Trametes* sp. FPB-115 (15,7 ± 0,3%) (FIGURA 39 B).

Figura 39 – Rendimento de açúcares (glicose e xilose) após sacarificação das BVBFs com extrativos.



Legenda: Rendimento de glicose (A) e xilose (B) das BVBFs (15 dias) com extrativos após hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C durante 24 h utilizando a enzima *Cellic CTec 3*[®] (*Novozymes*) (15 FPU g⁻¹). Rendimentos calculados com base nos teores de glucana e xilana das BVBFs com extrativos. Os dados mostrados representam as médias e desvios de análises realizadas em quadruplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey (p<0,05)

Fonte: Do autor (2019).

Estes dados mostram que a digestibilidade do cacho de dendê foi melhorada após o pré-tratamento biológico pelos fungos *F. flavus* FPB-04, *Pleurotus* sp. FPB-132 (glicose) e *F. flavus* FPB-04, *Trametes* sp. FPB-115 e *Pycnoporus* sp. FPB-116 (xilose). A redução da lignina após o pré-tratamento fúngico altera a estruturação da parede celular vegetal, melhorando assim, a acessibilidade a celulases e hemicelulases junto a

holocelulose, que também é alterada, de forma a conter mais regiões amorfas em relação a regiões cristalinas, presentes na biomassa controle (não tratada pelos macrobasidiomicetos) (FILLAT et al., 2017; WAN; LI, 2012; ZHAO et al., 2012).

Nesse sentido, os resultados sugerem que a deslignificação do cacho proporcionada por *F. flavus* FPB-04 (SLC = 2,96) em 15 dias nas condições testadas, pode ter facilitado sua digestibilidade durante a hidrólise. Recorrendo aos resultados das atividades enzimáticas do capítulo anterior, observamos que em relação as peroxidases (LiP e MnP), *F. flavus* FPB-04 apresentou atividades, fato que pode justificar sua atuação sobre a lignina do CVD.

Uma alternativa para a redução da lignina de biomassas vegetais pode ser a utilização do pré-tratamento com enzimas ligninolíticas (GIACOBBE et al., 2018). A adição dos mediadores 1-hidroxibenzotriazole (HBT) e sulfato de manganês (MnSO₄), levou a um incremento na atividade de enzimas lignolíticas aos extratos enzimáticos produzidos por *P. sanguineus* UPM4. Em sequência o cacho de dendê foi pré-tratado com estes extratos e depois hidrolisado, levando a rendimentos significativos de açúcares fermentescíveis (ZANIRUN et al., 2015)

Adicionalmente, em estudos de otimização, a melhoria na sacarificação do cacho de dendê foi atribuída entre outros fatores, ao pré-tratamento prévio com a enzima lacase de *Myceliophthora thermophila* 51003 (Novozymes) (ISHMAEL et al., 2016; SHAH et al., 2016)

Tem se buscado a utilização de consórcios microbianos, combinando-se cultivo de fungos de podridão branca e/ou marrom (*white – rot or Brown-rot fungi*) consistindo em uma alternativa viável e promissora para melhoria da digestibilidade enzimática, reduzindo a necessidade de longos períodos de cultivo, como ocorre em pré-tratamentos biológicos convencionais (WANG, R. et al., 2017). Para isso é importante utilizar linhagens fúngicas que em curto período de tempo, promovam redução da lignina.

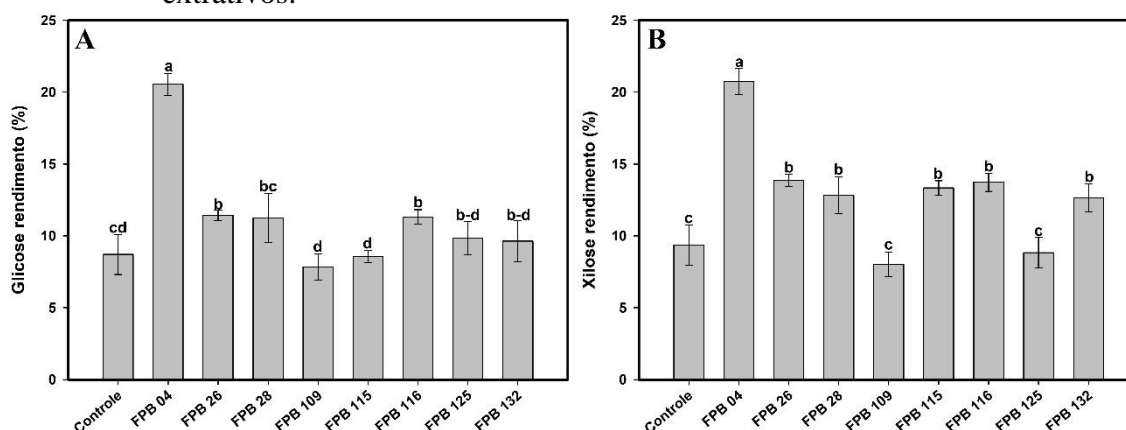
A eficiência destes fungos na desconstrução da biomassa lignocelulósica, tem incentivado o emprego dos mesmos em combinações, incluindo outros pré-tratamentos. O pré-tratamento sequencial (vapor + fermentação com *I. lacteus*) da madeira de faia (*Fagus sylvatica*), promoveu melhor rendimento de glicose (BRETHAUER; LAWRENCE; HANS-PETER, 2017). Combinando-se o pré-tratamento físico (redução de partícula) e o biológico com o fungo *P. ostreatus* foi alcançado maior rendimento de metano em comparação com a biomassa não tratada (MUSTAFA et al., 2017).

Contudo, um pré-tratamento biológico eficaz não necessita de redução na partícula da biomassa, de modo a garantir as frações de pentose (hemicelulose), evitar a formação de inibidores microbianos e reduzir os custos. Assim, a quebra e remoção da lignina dos materiais, tem sido o alvo de pesquisas com macro-basidiomicetos uma vez que este polímero contribui para a recalcitrância dificultando a ação de enzimas na etapa de sacarificação dos polissacarídeos (celulases) (WAGNER et al., 2018).

3.6 Sacarificação das BVBFs livres de extrativos

Em relação a sacarificação das BVBFs sem extrativos, a linhagem *Flavodon flavus* FPB-04 foi a que promoveu os maiores rendimentos tanto para glicose ($20,5 \pm 0,7\%$) (FIGURA 40 A), como para xilose ($20,7 \pm 0,9\%$) (FIGURA 40 B). Apesar de as outras linhagens terem promovido rendimentos inferiores (glicose e xilose), variações na sacarificação da biomassa em comparação com o controle (amostra sem fungo).

Figura 40 – Rendimento de açúcares (glicose e xilose) após sacarificação das BVBFs sem extrativos.



Legenda: Glicose (A) e rendimento de xilose (B) das BVBFs (15 dias) livres de extrativos após hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C durante 24 h utilizando a enzima Cellic CTec 3® (Novozymes) (15 FPU g⁻¹). Rendimentos calculados com base nos teores de glucana e xilana das BVBFs livres de extrativos. Os dados mostrados representam as médias e desvios de análises realizadas em quadruplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Do autor (2019).

Vencer a barreira física de resíduos lignocelulósicos é a chave para utilização facilitada como matéria-prima e obtenção de produtos de valor agregado como açúcares fermentescíveis, biopolímeros, etc. Nessa linha, apesar dos esforços em identificar métodos de pré-tratamento em biomassas com diferentes características estruturais

(composição), há muito para ser elucidado em relação a recalcitrância da lignocelulose (WANG, Z. et al., 2018).

Outra porção das biomassas vegetais que ocorre em proporções que variam de espécie para espécie e fatores intraespecíficos como idade e condição de cultivo, corresponde aos extrativos. Estes, por sua vez, estão presentes nas biomassas lignocelulósicas e compreendem as substâncias não estruturais (ácidos graxos, açúcares simples, ceras e esteróis). São extraídos com solventes como água, etanol, acetona, benzeno e tolueno (KAN; STREZOV; EVANS, 2016). Dependendo do pré-tratamento utilizado sobre a biomassa, como explosão a vapor, por exemplo, pode levar a formação de compostos fenólicos (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Adicionalmente, vários produtos da quebra da biomassa, que incluem açúcares mono / oligoméricos provenientes da hemicelulose e da quebra da lignina, agem como substâncias inibidoras da hidrólise enzimática (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Foi demonstrado que os extrativos podem interferir na sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos, pois, podem se ligar na celulose e também às enzimas hidrolíticas (OLESON; SCHWARTZ, 2018).

Com base nisso, os resultados obtidos, sugerem que a remoção dos extrativos que eventualmente ainda permaneciam nas BVBFs, reduziu possíveis efeitos inibitórios sobre a enzima *Celic CTec3*, melhorando consideravelmente os rendimentos de glicose e xilose do cacho pré-tratado por *Flavodon flavus* FPB-04 após a sacarificação (FIGURA 40).

3.7 Combinações de pré-tratamentos e hidrólise do CVD

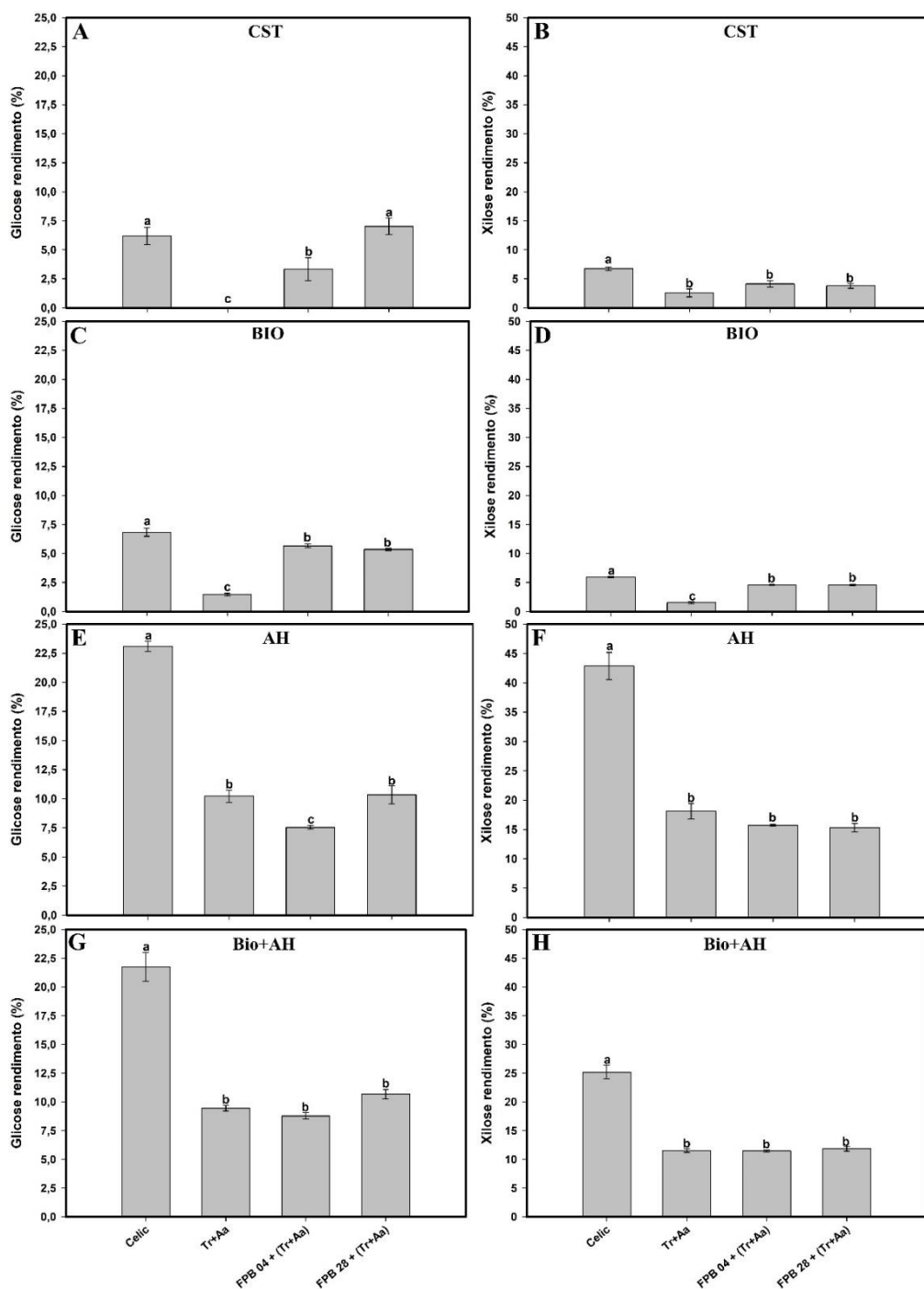
Os resultados das hidrólises realizadas com o CVD sem pré-tratar e submetido a combinações de pré-tratamentos, são mostrados na Figura 41. O pré-tratamento biológico com o fungo *F. flavus* FPB-04 melhorou a digestibilidade do cacho para a enzima comercial levando aos rendimentos de 6,8% e 5,9% de glicose e xilose, respectivamente (FIGURA 41 C-D). Neste caso, apesar dos menores rendimentos, as combinações enzimáticas [FPB-28 + (Tr+Aa)] e [FPB-04 + (Tr+Aa)], levaram a maiores liberações de açúcares em comparação ao *mix* (Tr+Aa).

O pré-tratamento hidrotérmico permitiu melhores rendimentos de açúcares, principalmente utilizando a enzima comercial (23,07%) glicose e (42,86%) xilose (FIGURA 41 E-F), em comparação com os demais tratamentos. Já em relação aos EBEs dos macro-basidiomicetos nas misturas, o combo [FPB 28 + (Tr+Aa)] e (Tr+Aa) levaram

aos rendimentos de glicose 10,34% e 10,22, respectivamente superando o rendimento de [FPB 04 + (Tr+Aa)] com 7,54% (FIGURA 41 E).

Em relação ao pré-tratamento combinado (biológico + hidrotérmico), de maneira geral, os valores de glicose ficaram próximos daqueles alcançados com o cacho de AH (FIGURA 41 F-G).

Figura 41 – Rendimento de açúcares (glicose e xilose) do CVD pré-tratado e sem pré-tratar.



Legenda: Hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C durante 24 h utilizando a enzima Cellic CTec 3® (Novozymes) (15 FPU g⁻¹) e combinações de EBE de macro-basidiomicetos e EBE de ascomicetos, sobre o cacho pré-tratado e não tratado. (A e B) Rendimento de glicose e xilose do CST após hidólise, respectivamente; (C e D) Rendimento de glicose e xilose do BIO após hidólise, respectivamente; Rendimento de glicose e xilose do AH após hidólise, respectivamente; Rendimento de glicose e xilose do Bio+AH após hidólise, respectivamente; Os dados mostrados representam as médias e desvios de análises realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Fonte: Do autor (2019).

Entre os fatores que limitam a hidrólise estão a cristalinidade da celulose, grau de polimerização e teor de lignina na superfície (LAURENO-PEREZ et al., 2005; KOULLAS et al., 1992). Para isso, a utilização de pré-tratamentos biológicos com fungos de podridão branca representa uma alternativa de baixo custo e ambientalmente correto (AKHTAR et al., 2016).

Com efeito direto sobre a recuperação de açúcares para a obtenção de etanol, por exemplo, a biodelignificação tem sido empregada antes de pré-tratamentos químicos (YU et al., 2010). A combinação de pré-tratamentos é uma estratégia na busca de aumento nos rendimentos da sacarificação de biomassas lignocelulósicas. Por isso, estudos tem incentivado também o uso de consórcios microbianos (KALYANI et al., 2013) ou combinações entre os pré-tratamentos (HSU, 2018).

Por possuírem um repertório de enzimas ligninolíticas e acessórias como as LPMOs, os macrobasidiomicetos se mostram viáveis para uso em pré-tratamentos biológicos de biomassas agroindustriais, uma vez que podem desconstruir parcialmente a biomassa permitindo melhor digestibilidade durante a sacarificação. Contudo ainda é preciso otimizar as condições de cultivo de modo a reduzir o tempo de colonização do substrato e garantindo os maiores rendimentos de açúcares.

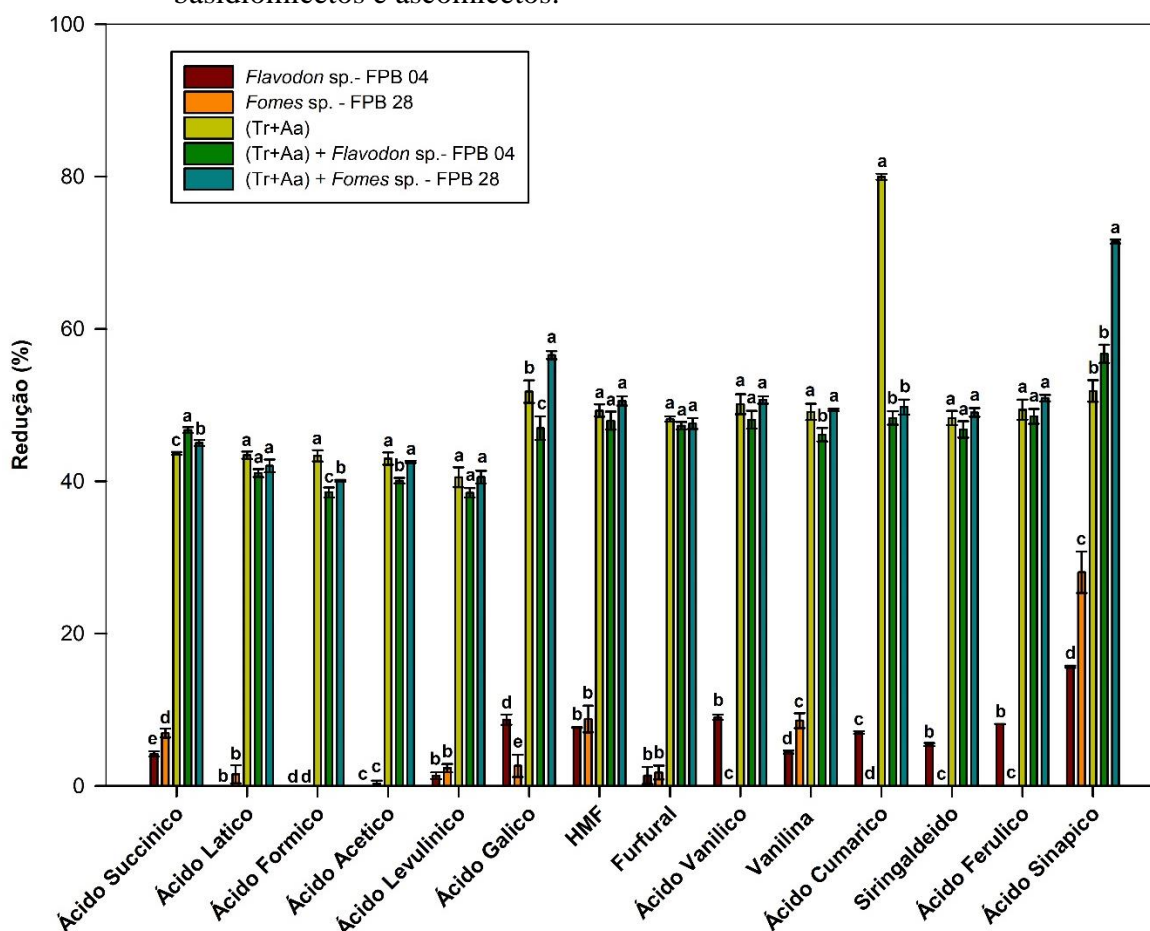
3.8 Avaliação de EBEs de macro-basidiomicetos e ascomicetos na remoção de compostos fenólicos e inibidores

Os resultados referentes a simulação da hidrólise, que avaliou o potencial de redução / consumo de substâncias fenólicas, podem ser verificados na Figura 42 e Apêndice B. As porcentagens de redução dos compostos variaram entre os tratamentos. O EBE contendo apenas enzimas de *T. reesei* e *A. aculeatus*, promoveu a redução de todas as substâncias, principalmente o ácido cumárico (79,9%). Em alguns casos, a combinação com EBEs de macro-basidiomicetos também proporcionou reduções ainda maiores em algumas substâncias.

A adição do EBE de *F. fasciatus* FPB-28 reduziu de forma significativa a concentração de ácido gálico e sinápico. Em relação ao ácido gálico, a combinação [FPB-28 + (Tr+Aa)] levou a redução de 56,5%, enquanto (Tr+Aa) fora da combinação proporcionou redução de 51,7%. A ação do EBE de FPB-28 também reduziu a concentração de ácido sinápico, levando a redução de 71,4%, frente a 56,7% de redução proporcionada pela combinação [FPB-04 + (Tr+Aa)] e 51,8% por (Tr+Aa).

Em relação ao ácido succínico, a combinação [FPB-04 + (Tr+Aa)], promoveu maior redução 46,7% seguido de [FPB-28 + (Tr+Aa)] (45,02%) e (Tr+Aa) (43,6%). Observou-se ainda, que nas condições avaliadas, os EBEs de macro-basidiomicetos sozinhos, promoveram reduções inferiores quando comparados com (Tr+Aa).

Figura 42 – Redução (%) de substâncias fenólicas e inibitórias por EBEs de macro-basidiomicetos e ascomicetos.



Legenda: Simulação da hidrólise enzimática a pH 5,0 e 50 °C durante 180 minutos utilizando a combinação de EBE de macro-basidiomicetos e EBE de ascomicetos. Os dados mostrados representam as médias e desvios de análises realizadas em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2019).

Compostos fenólicos gerados durante o pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, reduzem a atividade das celulases, além disso, podem inibir bactérias e leveduras nos processos fermentativos (KONT et al., 2013; RASMUSSEN, H et al., 2017).

Foi demonstrado que os fenóis: vanilina, siringaldeído, ácido trans-cinâmico e ácido hidroxibenzóico, por exemplo, inibem a hidrólise da celulose em torta úmida de

milho (XIMENES et al., 2010). Estas substâncias podem alterar a conformação estrutural das proteínas, levando a sua inativação (BOUKARI et al., 2011). Apesar de alguns estudos indicarem as causas da diminuição da eficiência de hidrólise, ainda sabe-se pouco a respeito dos mecanismos envolvidos no processo de inibição enzimática (ÁZAR et al., 2018).

Na natureza, os fungos basidiomicetos, desenvolveram habilidades bioquímicas para lidar com os produtos da degradação da lignina, bem como substâncias de defesa das plantas (SCHMIDT-DANNERT, 2016). Parte do sucesso em lidar com substâncias tóxicas, tem sido associado às mono-oxigenases do citocromo P450, que constituem o sistema de defesa fúngico contra xenobióticos (ICHINOSE, 2013).

Os resultados apresentados na Figura 42 demonstram que há sinergismo entre EBEs de macro-basidiomicetos e ascomicetos na redução de alguns compostos fenólicos. Nas condições testadas, *F. fasciatus* FPB-28, demonstrou ser um bom candidato para pesquisas envolvendo inibidores, levando-se em conta que os EBEs dos macrofungos não foram otimizados e também o coquetel, como também uma curva analítica de degradação ao longo do período de 72 horas, que é o tempo normalmente avaliado em processos de hidrólise enzimática de biomassas vegetais, previamente pré-tratadas (química ou fisicamente).

4 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou vantagens do pré-tratamento biológico do cacho vazio de dendê por meio do cultivo de macro-basidiomicetos, melhorando o processo de sacarificação. O macro-basidiomiceto *Flavodon flavus* FPB-04 foi a espécie que com 15 dias de pré-tratamento da biomassa, apresentou maior seletividade SLC sobre a lignina do cacho vazio de dendê. Dessa forma, o objetivo específico OE4 foi alcançado. Adicionalmente, o fungo *F. fasciatus* FPB-28, demonstrou secretar substâncias em seu extrato enzimático que promovem a redução de compostos fenólicos.

Portanto, estes fungos merecem ser melhor investigados, pois, constituem modelos biotecnológicos com potencial geração de produtos e utilização em biorrefinarias. Tanto que estes dois macro-basidiomicetos foram selecionados para realização do sequenciamento de genoma. Tendo assim, a chance de analisar um pouco mais o potencial destes fungos nos processos de desconstrução de biomassa vegetal para obtenção de bioprodutos de valor agregado, por meio do arsenal enzimático/genes que compõe o genoma destes macro-basidiomicetos.

REFERÊNCIAS

ÁZAR, R. I. L. et al. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. **Enzyme and microbial technology**, v. 109, p. 25-30, 2018.

BOUKARI, I. et al. Probing a family GH11 endo- β -1, 4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 130-138, 2011.

BRETHAUER, S.; LAWRENCE, S. R.; HANS-PETER, S. M. Enhanced simultaneous saccharification and fermentation of pretreated beech wood by in situ treatment with the white rot fungus *Irpex lacteus* in a membrane aerated biofilm reactor. **Bioresource technology**, v. 237, p. 135-138, 2017.

DA SILVA MACHADO, A.; FERRAZ, A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. **Bioresource technology**, v. 225, p. 17-22, 2017.

DE JONG, E.; JUNGMEIER, G. Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In: (Ed.). **Industrial biorefineries & white biotechnology**: Elsevier, 2015. p.3-33.

FILLAT, Ú. et al. Laccases as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: a review. **Fermentation**, v. 3, n. 2, p. 17, 2017.

GARCÍA-TORREIRO, M. et al. Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 486-492, 2016.

GHASEMZADEH, R.; MOSAVIAN, M. T. H.; KARIMI, A. Analysis of biological pretreatment of rapeseed straw with white rot fungi for enzymatic hydrolysis. **Maderas. Ciencia y tecnología**, v. 20, n. 4, p. 725-736, 2018.

GIACOBBE, S., Pezzella, C., Lettera, V., Sannia, G., & Piscitelli, A. Laccase pretreatment for agrofood wastes valorization. **Bioresource technology**, 265, 59-65, 2018.

HERMOSILLA, E. et al. Sequential white-rot and brown-rot fungal pretreatment of wheat straw as a promising alternative for complementary mild treatments. **Waste management**, v. 79, p. 240-250, 2018.

ICHINOSE, H. Cytochrome P 450 of wood-rotting basidiomycetes and biotechnological applications. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 71-81, 2013.

ISHMAEL, U. C. et al. Statistical modeling and optimization of enzymatic pretreatment of empty fruit bunches with laccase enzyme. **Bioresources**, v. 11, n. 2, p. 5013-5032, 2016.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.
- KALYANI, D. et al. Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. **Fuel**, v. 107, p. 815-822, 2013.
- KAMCHAROEN, A. et al. Screening and optimization of parameters affecting fungal pretreatment of oil palm empty fruit bunch (EFB) by experimental design. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, v. 5, n. 4, p. 303-312, 2014.
- KAN, T.; STREZOV, V.; EVANS, T. J. Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 1126-1140, 2016.
- KARIMI, K.; SHAFIEI, M.; KUMAR, R. Progress in physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. In: (Ed.). **Biofuel technologies**: Springer, 2013. p.53-96.
- KONT, R. et al. Strong cellulase inhibitors from the hydrothermal pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 135, 2013.
- Koullas, D. P., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J., & Koukios, E. G. Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. **Biotechnology and bioengineering**, 39(1), 113-116, 1992.
- Laurenó-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., & Dale, B. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass characterization of pretreated corn stover. **Appl Biochem Biotechnol**, 124, 1081-1099, 2005.
- LEE, K. T.; OFORI-BOATENG, C. **Sustainability of biofuel production from oil palm biomass**. Springer, 2013. ISBN 9814451703.
- MANDL, M. G. Status of green biorefining in Europe. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy**, v. 4, n. 3, p. 268-274, 2010.
- MILLATI, R. et al. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. **BioResources**, v. 6, n. 4, p. 5224-5259, 2011.
- MORENO, A. D. et al. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. **Critical reviews in biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 342-354, 2015.
- MUSTAFA, A. M. et al. Combinations of fungal and milling pretreatments for enhancing rice straw biogas production during solid-state anaerobic digestion. **Bioresource technology**, v. 224, p. 174-182, 2017.
- NEVES, P.; PITARELO, A.; RAMOS, L. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.

OLESON, K. R.; SCHWARTZ, D. T. Douglas-fir extractives inhibit saccharification. **Bioresource Technology Reports**, 2018.

PETTOLINO, F. A. et al. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. **Nature protocols**, v. 7, n. 9, p. 1590, 2012.

RASMUSSEN, H.; SØRENSEN, H. R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate research**, v. 385, p. 45-57, 2014.

RASMUSSEN, H. et al. New degradation compounds from lignocellulosic biomass pretreatment: routes for formation of potent oligophenolic enzyme inhibitors. **Green Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 464-473, 2017.

SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with *Phlebia brevispora* NRRL- 13108 for enhanced enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 2, p. 365-374, 2017.

SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.

SALVACHÚA, D. et al. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource technology**, v. 102, n. 16, p. 7500-7506, 2011.

SCHMIDT-DANNERT, C. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. **Current opinion in chemical biology**, v. 31, p. 40-49, 2016.

SERVICE, R. F. Battle for the barrel. **Science (New York, NY)**, v. 339, n. 6126, p. 1374, 2013.

SHAH, S. R. et al. Optimization of the enzymatic saccharification process of empty fruit bunch pretreated with laccase enzyme. **Bioresources**, v. 11, n. 2, p. 5138-5154, 2016.

SHIRKAVAND, E. et al. Pretreatment of radiata pine using two white rot fungal strains *Stereum hirsutum* and *Trametes versicolor*. **Energy Conversion and Management**, v. 142, p. 13-19, 2017.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SLUITER, A. et al. Determination of ash in biomass: laboratory analytical procedure (LAP). **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory analytical procedure**, v. 1617, p. 1-16, 2008.

SLUITER, A. et al. Determination of extractives in biomass. **Laboratory analytical procedure (LAP)**, 2008.

WAGNER, A. et al. Biological pretreatment strategies for second-generation lignocellulosic resources to enhance biogas production. **Energies**, v. 11, n. 7, p. 1797, 2018.

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

WANG, R. et al. Efficient Short Time White Rot–Brown Rot Fungal Pretreatments for the Enhancement of Enzymatic Saccharification of Corn Cobs. **ACST Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 11, p. 10849-10857, 2017.

WANG, Z. et al. Chemical and structural factors influencing enzymatic saccharification of wood from aspen, birch and spruce. **Biomass and bioenergy**, v. 109, p. 125-134, 2018.

XIMENES, E. et al. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 170-176, 2010.

YING, T. Y. et al. The effect of various pretreatment methods on oil palm empty fruit bunch (EFB) and kenaf core fibers for sugar production. **Procedia Environmental Sciences**, v. 20, p. 328-335, 2014.

Yu, H., Du, W., Zhang, J., Ma, F., Zhang, X., & Zhong, W. Fungal treatment of cornstalks enhances the delignification and xylan loss during mild alkaline pretreatment and enzymatic digestibility of glucan. **Bioresource Technology**, 101(17), 6728-6734, 2010.

ZANIRUN, Z. et al. Enhancement of fermentable sugars production from oil palm empty fruit bunch by ligninolytic enzymes mediator system. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 13-20, 2015.

ZHAO, L. et al. Fungal pretreatment of cornstalk with *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production. **Bioresource technology**, v. 114, p. 365-369, 2012.

ZULKIPLE, N.; MASKAT, M. Y.; HASSAN, O. Pretreatment of oil palm empty fruit fiber (OPEFB) with aqueous ammonia for high production of sugar. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 155-161, 2016.

**CAPÍTULO 4 – Sequenciamento, montagem *de novo* e anotação funcional do
genoma de *Flavodon flavus* FPB-04**

RESUMO

Flavodon flavus linhagem FPB-04, demonstrou ser seletivo SLC quando cultivado sobre cachos vazios de dendê, uma biomassa abundante proveniente da agroindústria de óleo de palma (*Elaeis* spp.). Informações preliminares indicaram uma cepa deste fungo, isolada em ambiente marinho, demonstrando apresentar potencial atividade lignolítica. O genoma desta espécie foi sequenciado pela equipe do portal *Mycocosm* onde obtiveram uma montagem de qualidade e com pouca fragmentação. Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de realizar o sequenciamento, montagem e anotação (estrutural e funcional) do genoma de *F. flavus* FPB-04 isolado do cerrado brasileiro. Utilizando as plataformas de sequenciamento de nova geração (inglês, NGS), *Pacific Biosciences (PacBio RS II)* e *Illumina (HiSeq 2500)* e uma estratégia de montagem híbrida com MaSuRCA, obteve-se 30.05 Mb do genoma deste fungo. Além disso, foram encontradas 8.477 regiões codificadoras de proteínas. Análises de similaridade entre as proteínas preditas no genoma de *F. flavus* e as sequências de proteínas de outros fungos, depositadas nos bancos de dados públicos, mostraram 77,4 % de *hit* com fungos da ordem *Polyporales*, principalmente, com *Phanerochaete carnosa*, *Sparassis crispa* e *Trametes versicolor*. De acordo com a análise de categorização funcional, o genoma de *F. flavus* FPB-04 mostrou um grande número de enzimas hidrolases, transferases e oxidoredutases presentes no genoma deste fungo. Além disso, foram previstos 233 genes que codificam enzimas ativas de carboidratos (*CAZymes*). De modo geral, os dados poderão ser úteis como referência para o sequenciamento de espécies relacionadas contribuindo com os estudos sobre a desconstrução da biomassa lignocelulósica, uma vez que *F. flavus* revelou ser um fungo seletivo (SLC) para deslignificação do CVD.

Palavras Chave: Sequenciamento. Anotação funcional. *Blast2GO/OmicsBox*. Basidiomicetos.

ABSTRACT

Flavodon flavus strain FPB-04 is selective SLC when grown on empty palm oil bunches, abundant biomass from the palm oil agribusiness (*Elaeis* spp.). Preliminary information indicated a strain of this fungus, isolated in the marine environment, showing potential ligninolytic activity. The genome of this species was sequenced by the *Mycocosm* portal team where they obtained a quality assembly with little fragmentation. Thus, this work was developed with the objective of sequencing, assembly, and annotation (structural and functional) of the genome of *F. flavus* FPB-04 isolated from the Brazilian cerrado. Using new generation sequencing platforms (NGS), Pacific Biosciences (PacBio RS II) and Illumina (HiSeq 2500) and a hybrid assembly strategy with MaSuRCA, 30.05 Mb of the genome of this fungus was obtained. Also, 8,477 protein-coding regions were found. Similarity analyzes between the proteins predicted in the *F. flavus* genome and the protein sequences of other fungi, deposited in public databases, showed 77.4% of hits with Poliporales fungi, mainly with *Phanerochaete carnosae*, *Sparassis crispa* and *Trametes versicolor*. According to the functional categorization analysis, the *F. flavus* FPB-04 genome showed a large number of hydrolases, transferases and oxidoreductases enzymes present in the genome of this fungus. Also, 233 genes encoding active carbohydrate enzymes (CAZymes) have been predicted. In general, the data may be useful as a reference for the sequencing of related species contributing to studies on the deconstruction of lignocellulosic biomass, since *F. flavus* was found to be a selective fungus (SLC) for CVD delignification.

Keywords: Sequencing. Functional annotation. *Blast2GO/OmicsBox*.

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, os macro-basidiomicetos constituem um grupo de fungos capazes de desconstruir todos os componentes da biomassa lignocelulósica, por possuírem enzimas lignolíticas, tais como lacases e peroxidases, em seu arcabouço enzimático (LIERS et al., 2011; MARTIN et al., 2011; NAZARPOUR et al., 2013).

Estes fungos são decompositores naturais de troncos e folhas na serapilheira de diferentes tipos de ambientes de floresta. Também apresentam um grande potencial biotecnológico como a remediação de resíduos industriais, pré-tratamento de biomassas para geração de coprodutos e produção de enzimas (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; SAHA et al., 2016; YANG et al., 2013). Além disso, algumas espécies de macrofungos são mais seletivas, agem preferencialmente sobre a lignina, melhorando o acesso à celulose e hemicelulose de materiais lignocelulósicos (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016; SAHA et al., 2017; SAHA et al., 2016).

Estudos genômicos demonstraram que estes fungos apresentam genes relacionados com a degradação da lignina (MARTINEZ et al., 2009; MARTINEZ et al., 2004). Em seguida, uma análise filogenômica com base na origem dos genes AA2, sugeriu que a origem desses organismos a cerca de 300 milhões de anos, coincidindo com o carbonífero (FLOUDAS et al., 2012).

Assim, nos últimos anos, os estudos genômicos envolvendo a classe Agaricomycetes apresentou um aumento expressivo, iniciando-se com o sequenciamento do genoma de *Phanerochaete chrysosporium* e atualmente o número de genomas só cresce, revelando as estratégias utilizadas para desconstruir a biomassa e permitindo estudos comparativos (DE VRIES; GRIGORIEV; TSANG, 2018; OHM et al., 2014; QIN et al., 2018).

Estas informações ajudam na elucidação e compreensão dos mecanismos de degradação da madeira e principalmente, remoção da lignina, viabilizando aplicações biotecnológicas e industriais dos macrofungos (PARK, Y.-J.; JEONG; KONG, 2018). Além disso, é possível investigar genes relacionados com a formação do corpo de frutificação, de interesse do mercado de cogumelos comestíveis, e de modo geral, permitindo a compreensão da biologia do desenvolvimento fúngico (GUPTA et al., 2018; KAMADA et al., 2010; OHM et al., 2011; PALMER; HORTON, 2006).

Nossos estudos anteriores revelaram que o pré-tratamento biológico do cacho vazio de dendê, um abundante resíduo da agroindústria do óleo de palma, com o fungo

Flavodon flavus FPB-04, isolado do bioma cerrado brasileiro, melhorou sua digestibilidade na hidrólise. Além disso, o extrato bruto enzimático, obtido a partir da fermentação em estado sólido (SSF) neste material apresentou efeito sinérgico em combinação com as enzimas comerciais *Celluclast* e *Novozyme-188* (Sigma-Aldrich), ao hidrolisar o CVD-AH (Capítulo 2, página 111).

Relatos anteriores mostraram que *Flavodon flavus* (Klotzsch) isolado de ervas marinhas em Mjimwema, no Oceano Índico Ocidental - ao largo da costa de Dar es Salaam, Tanzânia - também foi estudado por secretar enzimas lignocelulósicas a atuar sobre a descoloração de efluentes têxteis e corantes sintéticos (MTUI; NAKAMURA, 2008; RAGHUKUMAR et al., 1999).

Desse modo, neste capítulo será objeto o sequenciamento, montagem de novo e anotação do genoma da linhagem *Flavodon flavus* FPB-04, por se tratar de um fungo com características promissoras para aplicação biotecnológica na desconstrução de biomassas lignocelulósicas no contexto de plataformas industriais como biorrefinarias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas experimentais referentes ao isolamento e obtenção do DNA foram realizadas nas instalações da Embrapa Agroenergia situada em Brasília – DF. O isolamento, cultivo e manutenção da linhagem fúngica foram executadas no Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB), os procedimentos para obtenção do DNA genômico foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB). Já o sequenciamento de DNA foi realizado nas empresas contratadas Genone (<http://www.genone.com.br>) e Uniscience (<http://uniscience.com.br/>).

2.1 Estimativa taxonômica dos macro-basidiomicetos

A identificação molecular em nível de espécie é possível através do sequenciamento de regiões conservadas. As sequências obtidas são confrontadas com bases de dados curadas para confirmação por meio da similaridade. Nem sempre é possível identificar o gênero e espécie a partir de uma única região amplificada, permitindo apenas chegar ao gênero, dessa forma, é prudente tratarmos a identificação como “estimativa taxonômica” como ocorreu no presente trabalho onde sequenciou-se a região ITS (*Internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal das 8 linhagens de macro-basidiomicetos selecionados a partir do screening em resíduos da dendeicultura (capítulos 2 e 3).

2.1.1 Extração do DNA genômico

Para extração do DNA os fungos FPB-04; FPB-26; FPB-28; FPB-109; FPB115; FPB-116; FPB-125 e FPB-132 foram cultivados em placa de Petri contendo meio BDA durante 10 dias. Após colonização do meio de cultura, foram retirados 4 discos (7 mm de diâmetro) contendo micélio (inóculo) e transferidos para um cultivo líquido em frascos tipo *Erlenmeyer* (250 mL) com 50 mL de meio de cultura extrato de malte (20 g L⁻¹). Os frascos foram incubados a 28°C e 150 rpm por 15 dias. Após o crescimento, a massa micelial foi filtrada (em papel filtro) e lavada com água ultrapura estéril para remoção de meio de cultura remanescente. As amostras das massas miceliais foram acondicionadas em papel alumínio, mantidas em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C.

Para extração do DNA, os micélios foram triturados em cadinho com nitrogênio líquido e em seguida submetidos a extração de ácidos nucleicos com fenol/clorofórmio (RAEDER; BRODA, 1985). As amostras foram tratadas com RNase A (Thermo®). Na sequência, a qualidade do DNA genômico foi avaliada em gel de agarose 1%, em eletroforese utilizando o DNA de bacteriófago lambda com concentrações conhecidas como marcador.

2.1.2 Amplificação de fragmentos por PCR (Reação em cadeia da polimerase), purificação, sequenciamento e alinhamento em bases de dados

A partir do DNA genômico de cada isolado, foram amplificadas regiões ITS1-5.8S-ITS2 utilizando os primers ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (GARDES; BRUNS, 1993) e ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990) os quais amplificam uma região de aproximadamente 600 pb. A amplificação ocorreu em uma reação constituída de 0,2mM de DNTPs; 3,7mM de MgCl₂, tampão 1x (200mM Tris- HCL pH 8,4, 500 mM KCl) (Promega®); 1,5 U.μL⁻¹ de Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®); 0,8 μM de cada primer e 20 ng de DNA genômico quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies®). A reação de PCR foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems*® Foster City, CA) seguindo temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados sob luz UV. Os produtos de amplificação (100 μL) foram purificados utilizando *Quick Gel Extraction & PCR Purification Kit* (Invitrogen®). As amostras foram sequenciadas na empresa Myleus Biotechnology (www.myleus.com) por meio de eletroforese capilar utilizando o equipamento ABI3730. Os polímeros utilizados para o processo de sequenciamento foram o POP7 e o BigDye v3.1. As sequências obtidas foram analisadas no software *Geneious* (versão R11) e confrontadas com os bancos de dados: *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *CBS* (www.westerdijk.nl/collections), e *BOLD Systems* (<http://www.boldsystems.org/>), possibilitando a identificação das linhagens em nível de gênero através da ferramenta de busca de alinhamento básico local (BLAST).

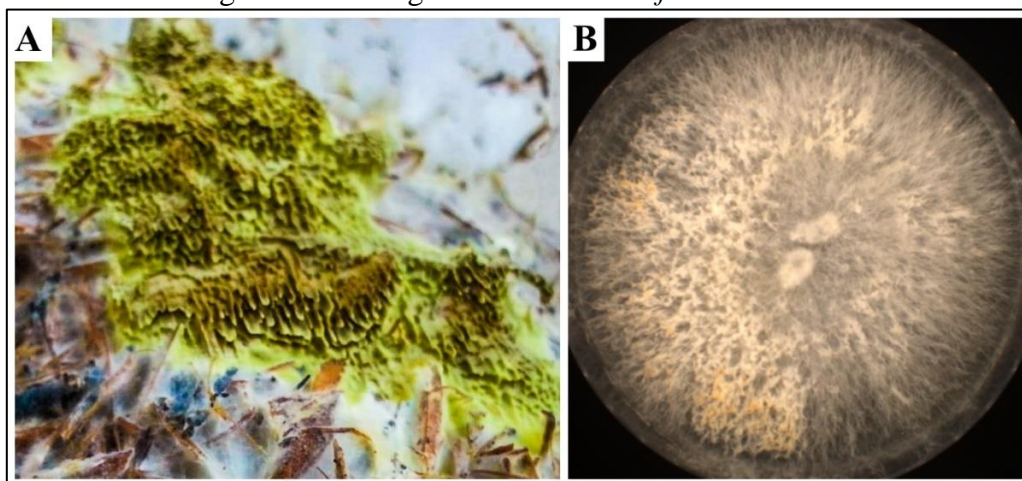
2.1.3 Construção de árvore filogenética

Para construção da árvore filogenética, utilizou-se os dados da região ITS do rDNA obtidos com a estimativa taxonômica da linhagem FPB-04 (*Flavodon flavus*) (fungo selecionado para sequenciamento do genoma com base na maior seletividade lignina/celulose – SLC). Também, utilizou-se sequências desta região de outras espécies da ordem Poliporales, disponíveis no banco de dados *GenBank*. Posteriormente, foram realizados alinhamentos utilizando o software Geneious (versão R11), com o modelo de distância genética Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993) e método de construção de árvore Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987).

2.2 Linhagem fúngica selecionada, condições de cultivo e obtenção de micélio

O basidiomiceto *Flavodon flavus* FPB-04 isolado do cerrado brasileiro, foi cultivado em placas de petri contendo meio BDA e mantido em câmara fria a 4 °C (FIGURA 43 A-B).

Figura 43 – Fotografia de *Flavodon flavus* FPB-04.



Legenda: (A) *F. flavus* colonizando e frutificando sobre o cacho de dendê e (B) crescimento *in vitro* em meio BDA.

Fonte: Do autor (2019).

Adicionalmente, discos de Ø 7mm do micélio foram armazenados em criotubos de 2 mL com água destilada autoclavada (CASTELLANI, 1967) em temperatura ambiente. Para obtenção do DNA genômico, o fungo foi cultivado em meio líquido caldo de batata (KASVI®) e extrato de malte (20 g L⁻¹) (Sigma-Aldrich®).

Os cultivos foram realizados em frascos *erlenmeyers* de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultura. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C, 1 atm durante 30 minutos. Após resfriamento do meio, empregou-se 10 discos miceliais Ø 7 mm do fungo em cada frasco. Posteriormente, foram mantidos em *shaker* de bancada a 28°C e 128 rpm durante 10 dias para obtenção de micélios. Decorrido o tempo de cultivo, os micélios foram obtidos por meio de filtração e o meio de cultivo remanescente foi removido através de lavagem com água ultrapura estéril. Os micélios foram triturados em almofariz com pistilo e nitrogênio líquido. Finalmente, cerca de 100 mg do macerado foi capturado em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, mantidos em nitrogênio e armazenados em ultrafreezer a - 80 °C até o momento das extrações.

2.3 Obtenção do DNA genômico

Para isolamento de DNA genômico, ao macerado obtido adicionou-se 700 µL de tampão CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0, NaCl 2 M, polivinilpirrolidona – PVP 2,5%) e 0,2 µL de β-mercaptoetanol obtendo-se uma concentração final de 0,2%. A incubação ocorreu durante 40 minutos e os tubos foram agitados vigorosamente a cada 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação, adicionou-se 700 µL da solução de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (CIA), agitou-se vigorosamente e os tubos foram deixados em posição horizontal em capela de exaustão por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C e a fase superior foi coletada.

Em seguida, adicionou-se 1,5 µL de RNase A (Thermo ®) nos sobrenadantes coletados e os tubos foram incubados a 37°C durante 40 minutos em banho seco. Adicionou-se então, 0,6 volumes de isopropanol e armazenou-se em freezer a -20 °C durante 2 horas. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante descartado cuidadosamente. O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 100% e posteriormente com 1 mL de etanol 70 %. Após secagem, os *pellets* foram ressuspensos em tampão TE (EDTA 1mM pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0) e a qualidade e integridade do DNA obtido foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop e gel de agarose 1%.

2.4 Preparos das bibliotecas e sequenciamento na plataforma *Illumina (HiSeq 2500)*

As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa Genone (<http://www.genone.com.br/>). Após avaliação da qualidade, o DNA foi fragmentado por enzima de restrição. A construção das bibliotecas de DNA ocorreu por meio dos processos de reparo final havendo a adição de adaptadores nas extremidades, purificação e amplificação por PCR. As bibliotecas foram sequenciadas por sequenciador *Illumina* de alto rendimento empregando-se a estratégia *paired-end*.

As sequências geradas (*reads* brutos), foram filtradas eliminando aquelas contendo adaptadores, *reads* contendo $N > 10\%$ e *reads* com baixa qualidade ($Q_{score} \leq 5$) (ERLICH et al., 2008; HANSEN; BRENNER; DUDOIT, 2010; JIANG et al., 2011; YAN et al., 2013). Os dados brutos obtidos foram então registrados em 2 arquivos FASTQ, um contendo a orientação *forward* dos fragmentos sequenciados e outro com a orientação *reverse* (COCK et al., 2009).

2.5 Preparos das bibliotecas e sequenciamento na plataforma *PacBio*

Amostras do DNA obtido, nos mesmos moldes citados anteriormente (2.2), foram enviadas para sequenciamento *PacBio* pela empresa Uniscience (<http://uniscience.com.br/>). As construções das bibliotecas ocorreram de acordo com as instruções do kit *PacBio Library Preparation*[®].

2.6 Análises de qualidade das sequências obtidas com a plataforma *Illumina*

O controle de qualidade das sequências foi realizado utilizando FastQC (versão 0.11.7) para verificar a presença de possíveis contaminantes, baixa qualidade de leitura e artefatos de PCR, conteúdo de GC, presença de adaptadores e *k-mers* super-representados (ANDREWS, 2010). Adicionalmente realizou-se a trimagem das sequências utilizando o *Trim Galore* (versão 0.4.4) (KRUEGER, 2012) para remoção de nucleotídeos com baixa qualidade no final das sequências e adaptadores.

2.7 Montagem híbrida do genoma de *Flavodon flavus*

Empregou-se uma estratégia de montagem híbrida utilizando o MaSuRCA (ZIMIN et al., 2013) combinando-se leituras curtas obtidas por *Illumina (short-read)* e leituras de maior comprimento obtidas pela tecnologia *PacBio (long-read)* (ANTIPOV et al., 2015) *k-mers* (21, 33, 55, 77, 99 e 127). A qualidade da montagem, antes e após trimagem, foi avaliada (GUREVICH et al., 2013).

2.8 Anotação estrutural e predição de genes

Foi realizada a anotação estrutural do genoma, a fim de prever genes presentes no genoma de *F. flavus*. Para realizar a predição *ab initio*, foi utilizado o software *Blast2GO/OmicsBox* (CONESA et al., 2005) que contém o algoritmo *Augustus* (versão 3.0.3) (HOFF; STANKE, 2013) (*genefind > Eukaryotic GeneFinding*). Para identificar genes com maior precisão, *Phanerochaete chrysosporium* (Poripolares) foi escolhido como gênero relacionado. Foram realizadas buscas por genes completos em ambas as cadeias para obtenção do número de proteínas.

2.9 Anotação Funcional

Utilizando o software *Blast2GO/OmicsBox*, por meio do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990), foi realizada uma busca por similaridade entre as sequências de proteínas encontradas no genoma de *Flavodon flavus* contra o banco de dados de proteínas não redundante (nr) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Posteriormente foi realizada a anotação com *InterProScan* a fim de recuperar informações de domínio/motivos de maneira sequencial. Os termos GO correspondentes foram transferidos para as sequências e mesclados com os termos GO existentes.

A próxima estratégia consistiu no mapeamento de ontologia genética (inglês, GO) e recuperação dos termos GO associados aos *hits* obtidos pela pesquisa do BLAST. Foram realizadas 4 etapas de mapeamento distintas. Na etapa 1 os acessos obtidos com o BLAST foram usados para recuperar nomes de genes ou símbolos, empregando-se dois arquivos de mapeamento fornecidos pelo NCBI (*gene_info*, *gene2accession*). Os nomes dos genes identificados foram pesquisados do banco de dados do Gene Ontology.

Na etapa 2, as identidades (IDs) principais do BLAST foram utilizadas para recuperar IDs UniProt (*Universal Protein Resource*) por meio de um arquivo de mapeamento de PIR (*Non-redundant Reference Protein Database*) incluindo PSD, UniProt, Swiss-Prot, TrEMBL, RefSeq, GenPept e PDB. Na etapa 3, os acessos foram pesquisados diretamente na tabela *dbxref* da base de dados do GO e finalmente, na etapa 4 foi realizada uma pesquisa na Tabela de produtos gênicos da base GO empregando-se os acessos do BLAST.

Então, procedeu-se com a anotação funcional onde os termos GO foram selecionados do *pool* GO obtido anteriormente e atribuídos às sequências de consulta. A regra de anotação (inglês, AR) empregada no *Blast2GO/OmicsBox* busca encontrar anotações mais específicas com certo nível de confiabilidade. Para cada candidato, uma pontuação de anotação (inglês, AS) foi calculada. O AS é composto por dois termos aditivos, o primeiro, termo direto (inglês, DT), refere-se a maior similaridade de acertos deste GO ponderado por um fato correspondente ao EC (1).

O segundo termo (AT) do AS forneceu a possibilidade de abstração. Isso foi definido como uma anotação para um nó pai (*parent node*) quando vários nós filhos (*children node*) estiveram presentes na coleção de candidatos GO (2). Este termo então multiplica o número total de GO unificados no nó por um fator de peso GO definido previamente. Finalmente, o AR seleciona o menor termo por ramificação que fica acima de um limite definido (3). DT, AT e os termos AR são definidos da seguinte forma:

$$DT = \max (similarity \times EC \ weight) \quad (1)$$

$$AT = (\#GO-1) \times GO \ weight \quad (2)$$

$$AR: \textit{lowest.node} (AS (DT+AT)) \geq \textit{threshold} \quad (3)$$

As sequências de proteínas de *F. flavus* com similaridade significativa com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados, foram analisadas quanto à sua categorização funcional (processo biológico, função molecular e componente celular) por meio do *Gene Ontology* (GO).

Figuras obtidas no *software Blast2GO/OmicsBox* apresentam informações em inglês, não permitindo sua modificação. A fim de facilitar a leitura e compreensão, os principais resultados encontram-se descritos no texto que as antecede.

2.9.1 Códigos Enzimáticos (EC)

A busca por códigos de enzimas (inglês, EC) foi realizada também no *software* através de busca na base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KANEHISA; GOTO, 2000) permitindo a obtenção de “*Kegg Maps*”, e visualização de vias metabólicas em que a(s) sequência(s) ou seu(s) produto(s) atua(m).

2.9.2 Identificação de enzimas ativas de carboidratos CAZymes

Os genes associados a hidrolases de glicosídeos (GHs), esterases de carboidratos (CEs), liases de polissacarídeos (PLs), glicosiltransferases (GTs), atividades auxiliares (AA) e módulos de ligação a carboidratos (CBMs), foram anotados através do meta servidor gratuito dbCAN2 (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>) (YIN et al., 2012; ZHANG et al., 2018) que integra três ferramentas / bancos de dados de última geração: HMMER (pesquisa contra banco de dados *dbCAN* HMM - Hidden Markov Model), DIAMOND (busca contra o banco de dados de sequência CAZyme pré-anotada de CAZy) e Hotpep (busca contra o banco de dados de peptídeos curtos CAZyme conservados).

2.9.3 RNAs funcionais

A busca por famílias de RNAs funcionais (RNA não codificantes, elementos cis-regulatórios estruturados e *self-splicing* RNAs) foi realizada no *Blast2GO/OmicsBox* executando o *Rfam* (KALVARI et al., 2017; KALVARI et al., 2018; NAWROCKI et al., 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estimativa taxonômica de basidiomicetos

As estimativas da classificação taxonômica dos macro-basidiomicetos (FPBs) selecionados a partir dos cultivos em placa e em estado sólido, foram obtidas a partir da amplificação da região ITS do DNA ribossomal, conforme apresentação feita na Tabela 7. Entre as 08 linhagens de macro-basidiomicetos selecionadas foram identificados pelo menos seis gêneros, tais como: *Flavodon*, *Fomes*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Pycnoporus* e *Coprinus* sp. A identificação molecular a nível de espécie não foi possível para a maioria das linhagens em função da limitação da comparação de apenas sequência de uma região. Não foram obtidas sequências de qualidade da linhagem FPB-26 o que impossibilitou sua identificação.

Tabela 7 – Estimativa taxonômica dos isolados fúngicos de macro-basidiomicetos (FPBs) por comparação das sequências obtidas com a amplificação da região ITS 1 e ITS 4 e aquelas depositadas em bases de dados. (continua)

Isolados FPBs	Gêneros prováveis ¹			
	Código	NCBI	CBS	BOLD Systems
FPB-04		<i>Flavodon flavus</i>	<i>Flavodon flavus</i>	<i>Flavodon flavus</i>
FPB-26		Nd	Nd	Nd
FPB-28		<i>Fomes fasciatus</i>	<i>Fomes fasciatus</i>	<i>Fomes fasciatus</i>
FPB-109		<i>Pleurotus</i> sp.	<i>Pleurotus</i> sp.	<i>Pleurotus</i> sp.
FPB-115		<i>Trametes</i> sp.	<i>Pycnoporus</i> sp.	<i>Pycnoporus</i> sp.
FPB-116		<i>Pycnoporus</i> sp.	<i>Pycnoporus</i> sp.	<i>Pycnoporus</i> sp.
FPB-125		<i>Coprinus</i> sp.	<i>Coprinus</i> sp.	<i>Coprinus</i> sp.
FPB-132		<i>Pleurotus</i> sp.	<i>Pleurotus</i> sp.	<i>Pleurotus</i> sp.

Legenda: ¹Os gêneros descritos apresentaram similaridade superior a 98% com isolados depositados nas bases de dados. Nd: Não determinado.

Fonte: Do autor (2019).

O emprego de marcadores ribossomais são menos passíveis de problemas (falhas no primer, ausência de produtos de PCR e duplicação de bandas) durante a amplificação por PCR quando comparados com marcadores que codificam proteínas (SCHÖCH et al., 2012). Além disso, o reino Fungi apresenta grande diversidade filogenética e ainda não foi descrito um único marcador para o reino, sendo preciso o emprego de dois ou mais marcadores para atingir melhor precisão na identificação molecular (BADOTTI et al., 2018; ZHAO et al., 2011).

De modo geral, a estimativa taxonômica obtida, nos permitiu conhecer gêneros de macro-basidiomicetos da biodiversidade do bioma Cerrado brasileiro e/ou adquiridos em compras em feiras (cogumelos comestíveis), que podem ser utilizados nas pesquisas e processos, tal como pré-tratamento biológico de biomassas lignocelulósicas para obtenção de bioprodutos de valor agregado, como açúcares solúveis fermentescíveis, entre outros.

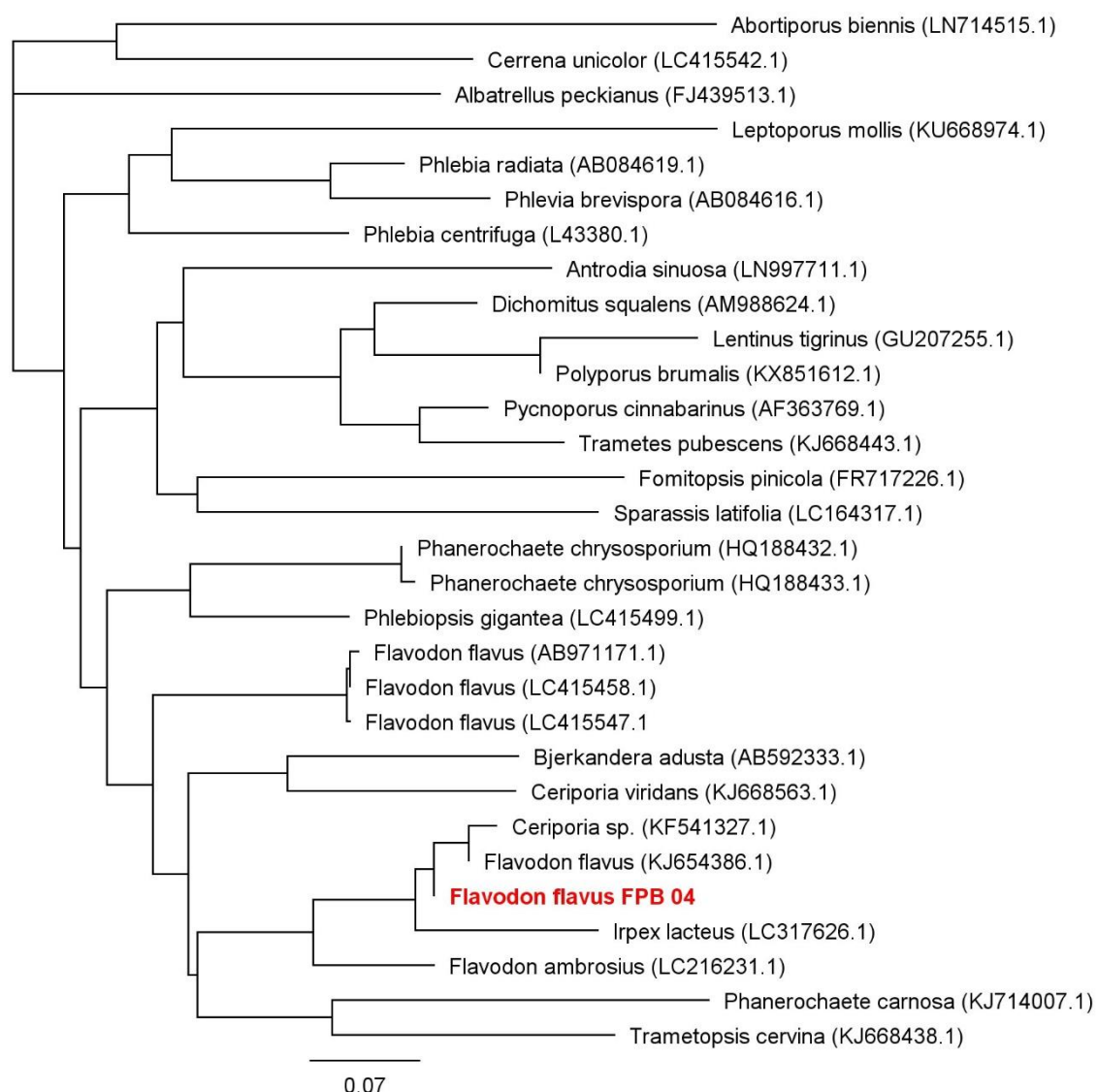
Apesar disso, para completa identificação desses fungos a nível de espécie, é preciso utilizar outros marcadores além do ITS. Para isso, são utilizados outros iniciadores que amplificam parcialmente a segunda subunidade maior da RNA polimerase (RPB2), genes β -tubulina, calmodulina, entre outros (XU, 2016).

Paralelamente a identificação por meio de regiões do DNA, nos últimos anos houve rápida evolução das tecnologias genômicas, permitindo acesso ao sequenciamento genômico completo de diferentes organismos. Em relação aos macro-basidiomicetos os genomas sequenciados têm revelado *insights* sobre o processo de colonização e desconstrução da lignocelulose (CHEN et al., 2016; FERNANDEZ-FUEYO et al., 2012; STAJICH, 2017; YANG et al., 2016).

3.1 Filogenia de *Flavodon flavus*

A árvore obtida evidenciou que *F. flavus* FPB-04 está filogeneticamente relacionado com *F. flavus* KJ654386.1 e *Ceriporia* sp. também encontra-se próximo de *Irpex lacteus* (FIGURA 44).

Figura 44 – Árvore filogenética baseada na região ITS do rDNA mostrando a posição filogenética de *F. flavus* FPB-04.



Legenda: As sequências foram submetidas à análise filogenética utilizando Geneious R11 para construir uma árvore de união de vizinhos mais próximos. Os números de acesso do GenBank para cada cepa estão listados entre parênteses. A barra de escala representa a substituição de 0,07 nucleotídeos por posição de nucleotídeo.

Fonte: Do autor (2019).

O gênero *Flavodon* pertence à família Irpicaceae (ordem Poliporales), assim como fungos do gênero *Irpex*, *Ceriporia*, *Byssomerulius*, *Efibula*, *Gloeoporus*, *Hydnopolyporus*, *Leptoporus*, *Meruliopsis* e *Trametopsis* (SPIRIN, 2003). Contudo, a inclusão de gêneros de outras famílias em Irpicaceae foi recentemente questionada (JUSTO et al., 2017). Fungos desta família (Irpicaceae), são considerados de podridão branca, com exceção do gênero *Lepdoporus* de podridão parda.

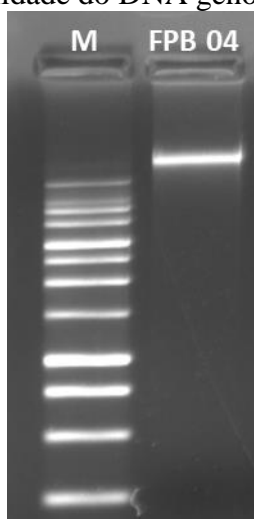
A caracterização molecular de uma cultura de *Flavodon flavus*, proveniente da Jamaica, foi realizada por Miettinen e colaboradores (2012), levando-os a incluírem esta

espécie ao lado de *Irpex lacteus*, uma espécie presente no clado flebóide dos Poliporales (BINDER et al., 2013) (MIETTINEN et al., 2012). Nesse sentido, análises filogenéticas moleculares, colocaram a espécie *Flavodon ambrosius* em uma linhagem com *F. flavus* se tratando de uma nova espécie (SIMMONS et al., 2016).

3.2 Qualidade do DNA genômico

Após cultivo de discos miceliais de *F. flavus* em meio extrato de malte durante 10 dias foi possível obter massa micelial suficiente para extração de DNA genômico. Foram obtidos $292 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA genômico de boa qualidade e integridade conforme gel de agarose mostrado na Figura 45.

Figura 45 – Qualidade do DNA genômico de *F. flavus*.



Legenda: Gel de agarose 1% com $1 \mu\text{L}$ de DNA genômico de *F. flavus* FPB-04 M: Marcador *GeneRuler™* 1 kb Plus *Thermo Fisher Scientific™*.

Fonte: Do autor (2019).

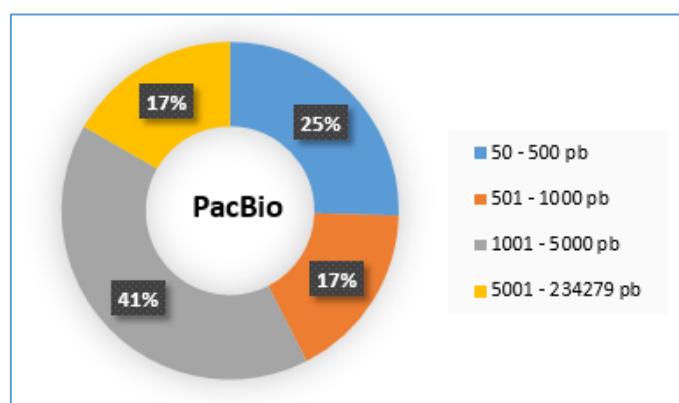
3.3 Qualidade das sequências após o sequenciamento na plataforma *Illumina*

Foram obtidas 19.814.265 sequências com comprimento de 150 pb e % GC = 50.

3.4 Sequências obtidas com o sequenciamento *PacBio*

Com o sequenciamento PacBio, obteve-se um total de 424.061 sequências com comprimento médio de 4624,147722 pb variando de 50 a 234.279 pb (FIGURA 46).

Figura 46 – Distribuição do tamanho das sequências com o sequenciamento PacBio



Fonte: Do autor (2019).

3.5 Montagem híbrida

Os resultados obtidos com a montagem híbrida (sequências *Illumina* + *PacBio*), utilizando o SPAdes estão exibidos na Tabela 8.

Tabela 5 – Características Genômicas do basidiomiceto *F. flavus*.

Características Gerais	
Tamanho total do genoma (pb)	30.057.423
Número de <i>Scaffolds</i>	1.448
Tamanho do maior <i>Scaffolds</i> (pb)	88.711
Tamanho do menor <i>Scaffolds</i> (pb)	2.963
N50 (pb)	25.841
Conteúdo de GC (%)	50.95
Nº de sequências codificadoras	8.477

Legenda: N50 = Tamanho mínimo dos *Scaffolds* que cobrem 50% do total de bases montadas.

Fonte: Do autor (2019).

Os principais fungos desconstrutores de biomassas lignocelulósicas pertencem a classe Agaricomycetos (Basidiomicetos). Esta classe possui cerca de 21.000 espécies e em sua maioria atuam sobre a madeira morta (KRAH et al., 2018). O tamanho do genoma desses fungos varia de 20 Mb até cerca de 200 Mb e o número de regiões codificadoras varia de 9.501 a 39.074 (LI et al., 2018).

O emprego de duas plataformas de sequenciamento de nova geração, *Illumina HiSeq 2500* e *PacBio RS II*, possibilitou a montagem híbrida *de novo* do genoma do fungo de podridão branca *F. flavus* linhagem FPB 04 que apresentou tamanho de 30.05 Mb. O

tamanho é superior ao encontrado recentemente e disponibilizado no portal *Mycocosm* (genome.jgi.doe.gov/programs/fungi) o qual possui 31,51 Mb.

As informações do sequenciamento de *F. flavus* 38 v.1.0 disponíveis no portal (<https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) sugerem uma montagem completa onde foram obtidos 29 *scaffolds* e ausência de “gaps”. Na montagem de genomas, algumas divergências são comuns devido a utilização de diferentes estratégias de sequenciamento (plataformas), montadores e preditores (GUO et al., 2016; NAGARAJAN; POP, 2013). No presente trabalho utilizou-se 2 plataformas de sequenciamento (Illumina e PacBio) enquanto que o sequenciamento de *F. flavus* 38 empregou-se a plataforma PacBio e o programa Falcon para montagem.

Adicionalmente, realizou-se uma comparação com o tamanho médio de genomas e número de regiões codificadoras de macro-basidiomicetos publicados, que pertencem a mesma classe de *F. flavus*. Observa-se que o tamanho médio dos genomas é de 40 Mb excetuando-se *Sphaerobolus stellatus* (176.37) e *Fibulorhizoctonia sp.* (95.12) (TABELA 9).

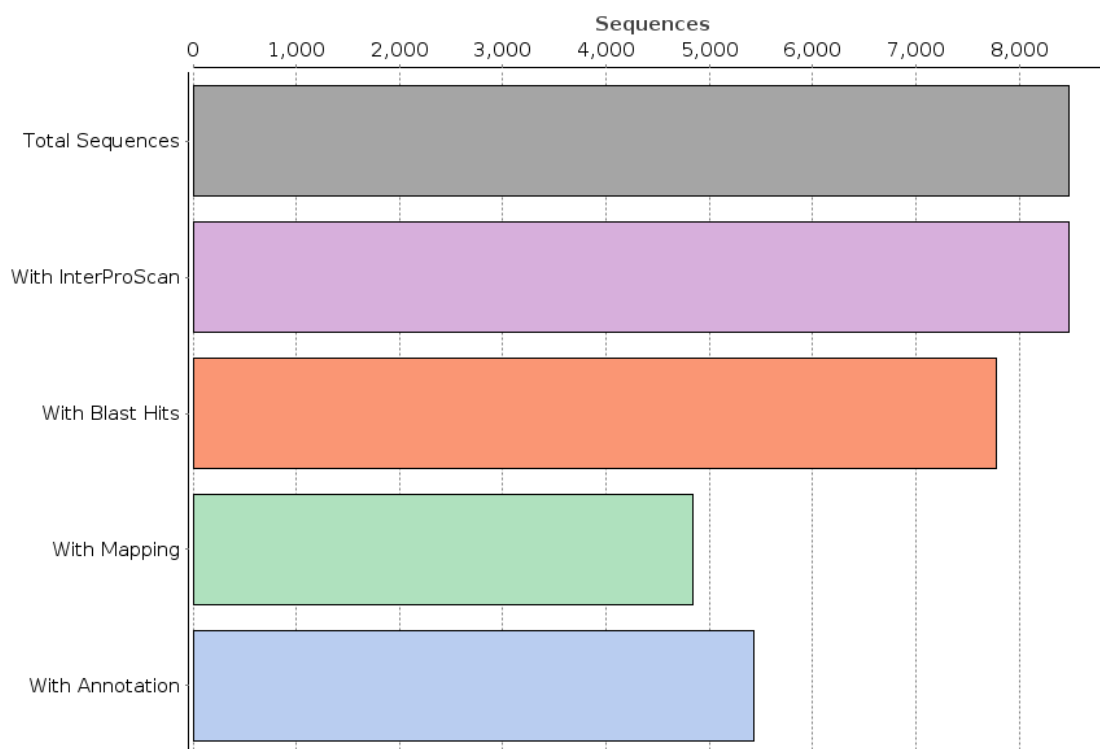
Tabela 6 – Espécies pertencentes a família Agaricomycetos que tiveram os genomas sequenciados e publicados nos últimos 5 anos. (Continua)

Espécie	Genoma (Mb)	Nº de regiões codificadoras	Referência
<i>Flavodon flavus</i>	30.05	8.477	Este trabalho
<i>Fomes fasciatus</i>	49.08	13.737	Este trabalho (capítulo 5)
<i>Flavodon flavus</i> 38 v 1.0	31.51	11.282	genome.jgi.doe.gov
<i>Polyporus inverno</i>	45.71	18.244	(MIYAUCHI et al., 2018)
<i>Serpula himantioides</i>	45.97	13.805	(BALASUNDARAM et al., 2018)
<i>Phlebia centrifuga</i>	34.84	13.785	(MÄKELÄ et al., 2018)
<i>Trametes pubescens</i>	39.75	14.451	(GRANCHI et al., 2017)
<i>Lentinula edodes</i>	46.10	14.002	(PARK et al., 2017)
<i>Rhizopogon vinicolor</i>	36.10	14.469	(MUJIC et al., 2017)
<i>Obba rivulosa</i>	34.03	13.206	(MIETTINEN et al., 2016)
<i>Phlebia radiata</i> Fr.	40.40	14.629	(KUUSKERI et al., 2016)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	35.63	12.206	(ALFARO et al., 2016)
<i>Fibulorhizoctonia sp.</i>	95.12	32.946	(NAGY et al., 2015)
<i>Sphaerobolus stellatus</i>	176.37	35.274	(KOHLER et al., 2015)
<i>Fistulina hepatica</i>	33.84	11.244	(FLOUDAS et al., 2015)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	35.14	13.602	(OHM et al., 2014)

3.6 Anotação estrutural do genoma de *F. flavus*

Foram previstos um total de 8.477 regiões codificadoras de proteínas (CDS). As informações referentes às ações do projeto utilizando as ferramentas do software *Blast2GO/OmicsBox* podem ser visualizadas na Figura 47.

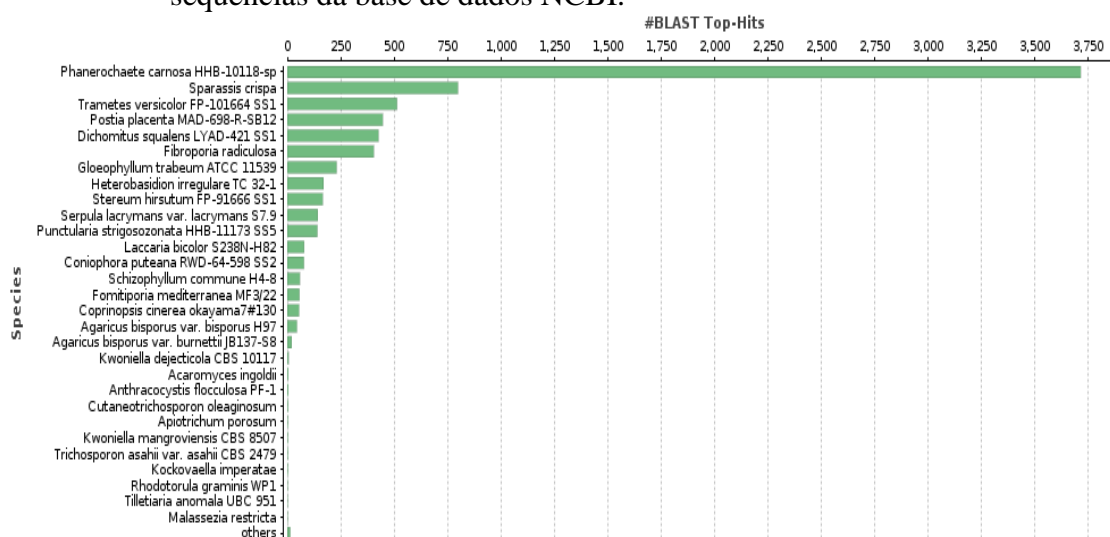
Figura 47 – Resumo das etapas executadas no *Blast2GO/OmicsBox* .



Fonte: Do autor (2019).

As proteínas preditas foram analisadas quanto à similaridade contra os bancos de dados de sequências de proteínas não redundantes (nr) do NCBI. Do conjunto de sequências que apresentaram *hits* no BLAST, 3.714 apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-3}$) com sequências de proteína de *Phanerochaete carnososa* HHB-10118-sp, 799 com sequências de proteínas de *Sparassis crispa*, 514 com *Trametes versicolor* FP-101664 SS1 e 2.576 com outros fungos (FIGURA 48).

Figura 48 – Resultado da busca por similaridade das sequências de *F. flavus* contra sequências da base de dados NCBI.



Legenda: Sequências de proteínas do genoma de *F. flavus* contra sequências de proteínas não redundantes da base de dados NCBI por meio do algoritmo BLASTp. No eixo y são mostradas as espécies com maior frequência na busca por similaridade. No eixo x são mostrados os números de proteínas encontradas para cada espécie.

Fonte: Do autor (2019).

A similaridade das sequências de *F. flavus* com sequências destas espécies, se justifica pelo fato de serem basidiomicetos muito estudados e por isso, apresentam muitas sequências depositadas em bancos de dados.

Desde a publicação do genoma de *P. chrysosporium* em 2004, as sequências de basidiomicetos tem aumentado nos últimos anos (OHM et al., 2014). Posteriormente, *P. carnosae* teve seu genoma sequenciado em 2012 revelando um conjunto completo de enzimas ativas de carboidrato (*CAZymes*), que atuam na conversão da lignocelulose, evidenciou também, um grande contingente de monoxigenases do citocromo P450 (HUANG et al., 2018; JURAK et al., 2018; SUZUKI et al., 2012). Trata-se, portanto, de um gênero muito estudado tendo em vista a dinâmica de desconstrução da madeira utilizado pelas espécies.

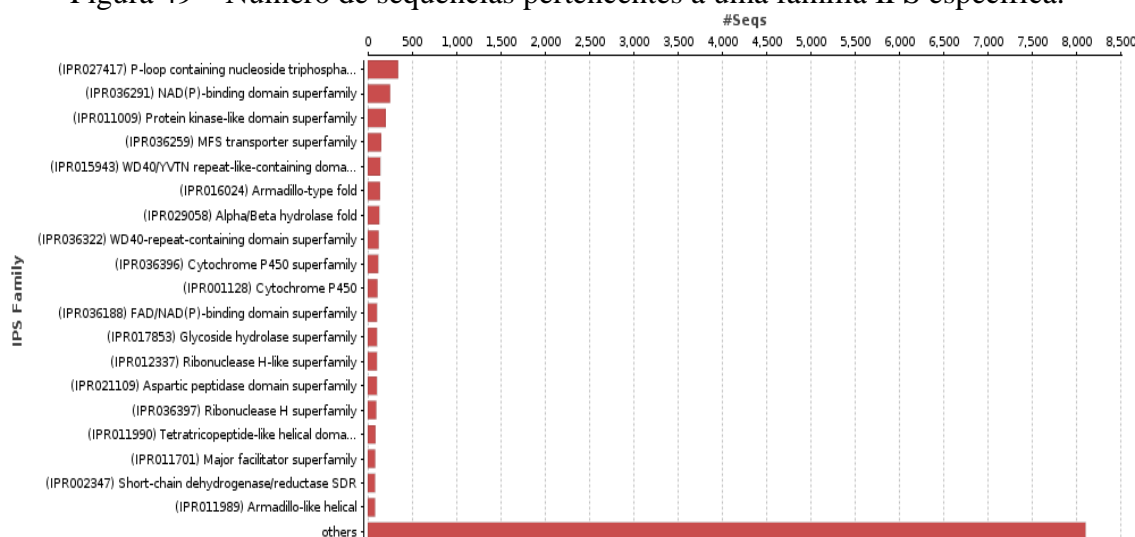
O cogumelo medicinal “couve flor” *Sparassis crispa*, tem sido muito estudado inclusive em nível de genoma devido a substâncias com propriedades farmacológicas (antitumoral, antiangiogênica, antimetastática, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-hipertensiva, antidiabética e antialérgica) (KIYAMA et al., 2018). Em relação a *Trametes versicolor*, este consiste em um basidiomiceto que apresenta produção de lacase, uma enzima oxidativa de interesse para o tratamento de xenobióticos industriais além de atuar sobre a lignina de materiais lignocelulósicos (BECK et al., 2018).

3.7 Classificação funcional das proteínas preditas

Com o *InterProScan* foi possível classificar as sequências proteicas recuperando informações como família, presença de domínios e sítios conservados. Para isto, o *Blast2GO/OmicsBox* utiliza modelos preditivos, reportados como assinaturas, disponibilizados por várias bases de dados que integram o consórcio InterPro (FINN et al., 2016).

Os resultados mostraram que 344 sequências proteicas de *F. flavus* que pertencem à superfamília homóloga “Loop-P contendo nucleosídeo trifosfato hidrolase (IPR 027417)” e 253 sequências pertencem a “superfamília de domínios de ligação NAD (P) (IPR 036291)”. Foram atribuídas famílias específicas para um certo número de sequências proteicas, contudo, com representações inferiores a estas (somadas em “outros” inglês, *others*) (FIGURA 49).

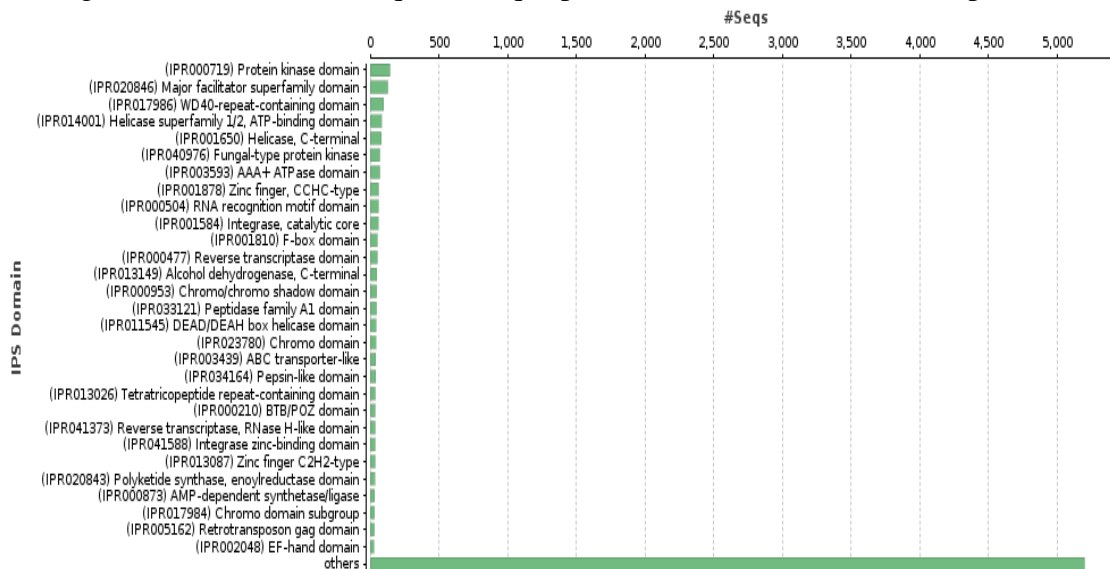
Figura 49 – Número de sequências pertencentes a uma família IPS específica.



Fonte: Do autor (2019).

De modo semelhante, a maior parte das proteínas (145) e (129) pertencem aos domínios “Proteína kinase (IPR 000719)” e “Superfamília de facilitadores principais (IPR 020846)”, respectivamente. A soma do número de proteínas com representações inferiores de outros domínios é apresentada em “outros” (FIGURA 50).

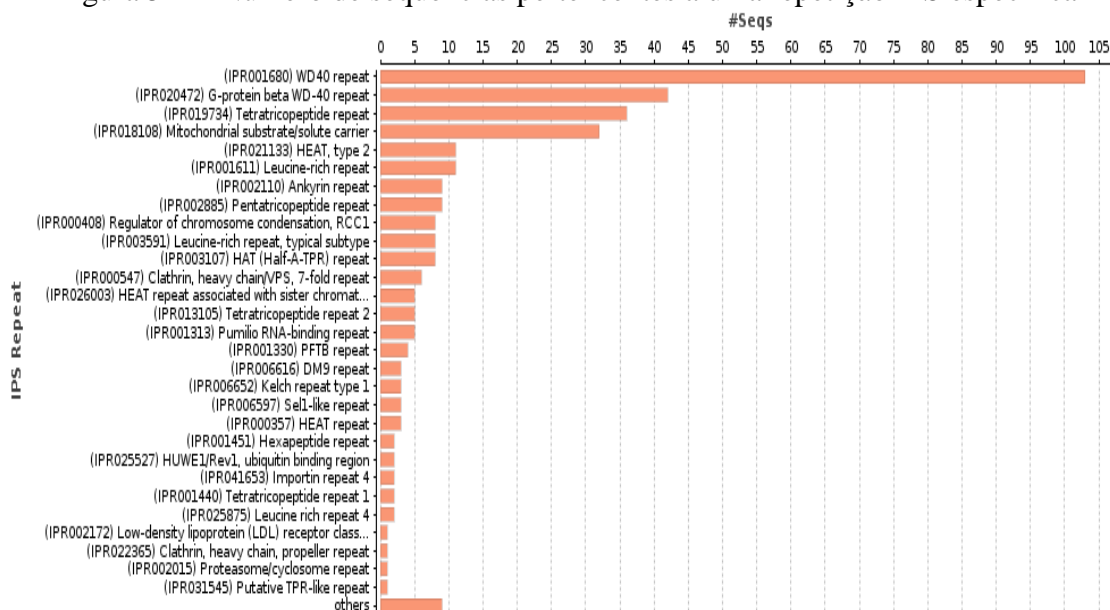
Figura 50 – Número de seqüências que pertencem a um domínio IPS específico.



Fonte: Do autor (2019).

Em relação a distribuição das repetições IPS, o número de seqüências de proteínas que apresentam o motivo “WD40 (IPR 001680)” é predominante (103 proteínas representadas). Em seguida, as seqüências com os motivos repetição da proteína G beta WD-40 (IPR 020472), uma proteína envolvida na transferência de energia (substrato mitocondrial / portador de soluto) (IPR 018108) e o motivo repetição do tetratricopeptídeo (IPR 019734) também se destacaram no conjunto com 42, 36 e 32 proteínas, respectivamente (FIGURA 51).

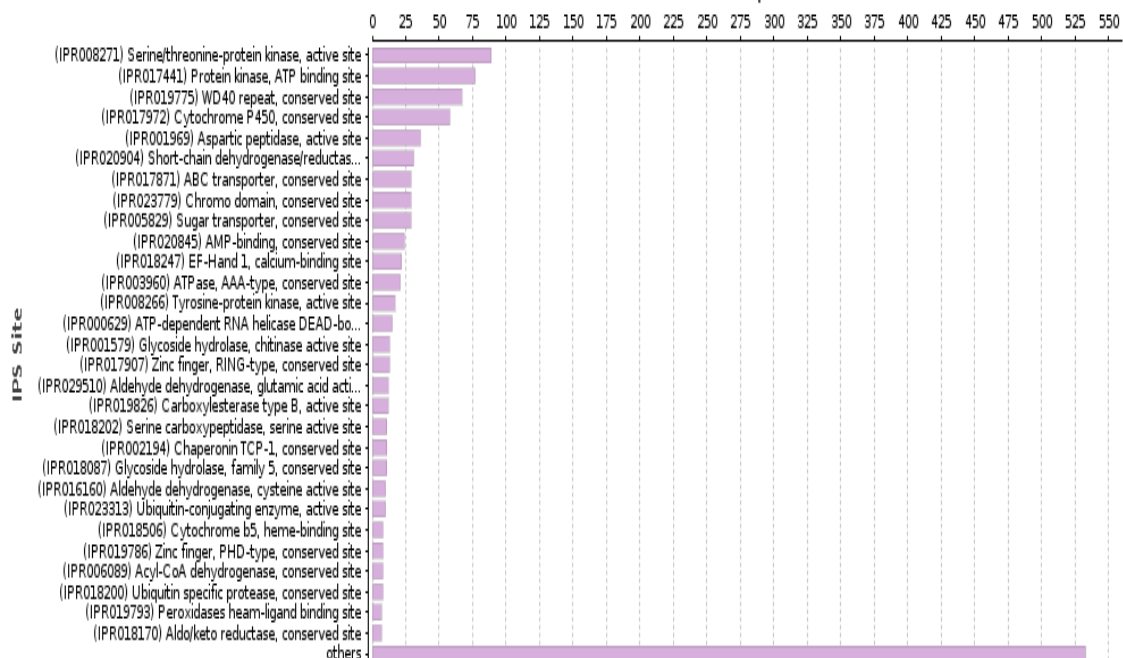
Figura 51 – Número de seqüências pertencentes a uma repetição IPS específica



Fonte: Do autor (2019).

Em relação aos sítios, 89 seqüências estão representadas no “sítio ativo da serina/treonina – proteína kinase (IPR008271)” e outras 77 no “sítio de ligação de ATP – proteína kinase (IPR017441)” (FIGURA 52).

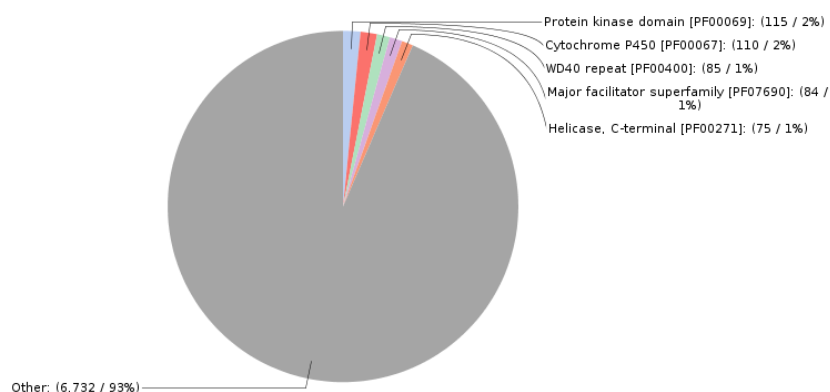
Figura 52 – Distribuição de sítios *InterProScan*



Fonte: Do autor (2019).

Os domínios encontrados com a consulta na base Pfam evidenciaram os domínios proteína kinase (PF00069) e citocromo P450 (PF00067) como os domínios mais representados com 115 e 110 proteínas, respectivamente. (FIGURA 53).

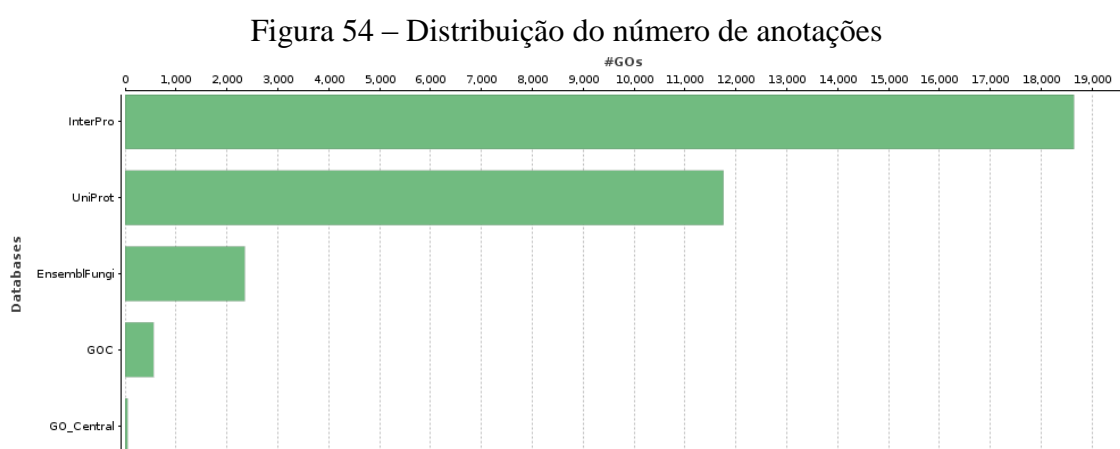
Figura 53 – Domínios *InterProScan* recuperados da base de dados *Pfam*.



Fonte: Do autor (2019).

3.8 Mapeamento de Ontologia Genética

O mapeamento foi realizado com parâmetros padrão do software *Blast2GO/OmicsBox* recuperando os termos do *Gene Ontology* (GO) associados a cada sequência. As bases de dados consultadas e a quantidade de termos encontrados em cada uma pode ser visualizado na Figura 54. Percebe-se que a *Base InterPro* apresentou maior número de termos associados as sequências de *F. flavus* (18.641) seguido da Base UniProt (11.756) e EnsemblFungi (2.350).



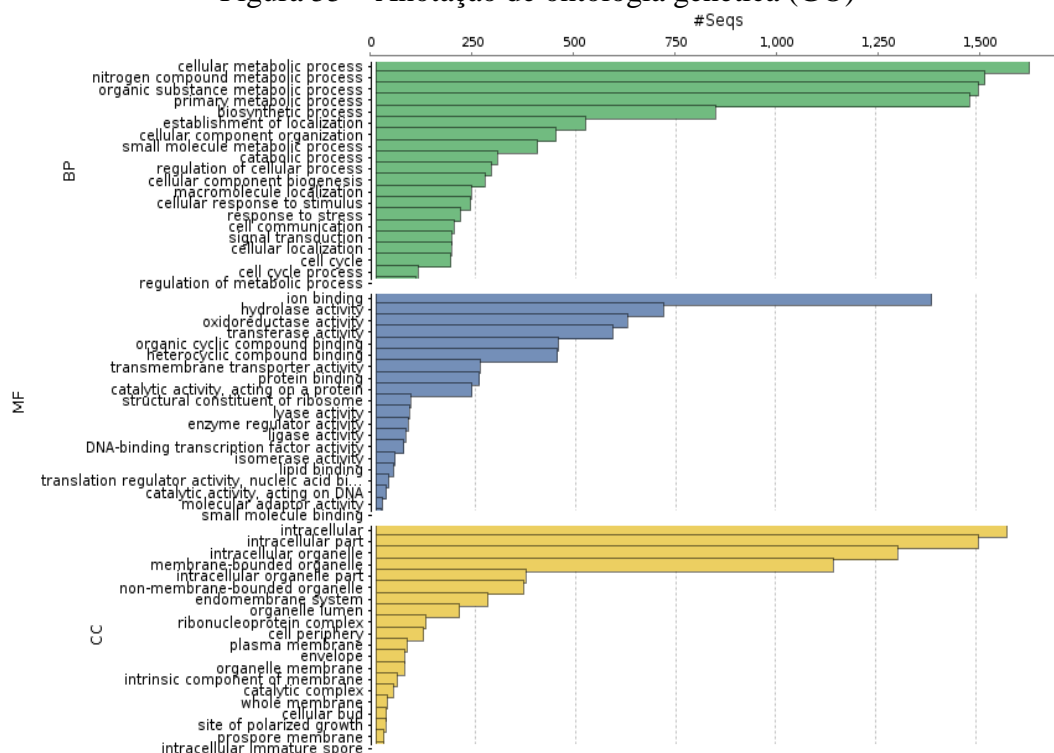
Legenda: (Termos GO) recuperadas dos diferentes bancos de dados.

Fonte: Do autor (2019).

3.9 Anotação de ontologia genética

Foram obtidas 23.947 anotações distribuídas em três categorias (Componente Celular, Função molecular e Processo biológico) o nível hierárquico 03 do GO (FIGURA 55). Algumas proteínas foram anotadas em mais de uma categoria, contudo, Processos Biológicos foi a categoria mais representada com 10.900 anotações seguida de Componente Celular com 7.457 anotações e por último, Função Molecular com 5.590 anotações.

Figura 55 – Anotação de ontologia genética (GO)

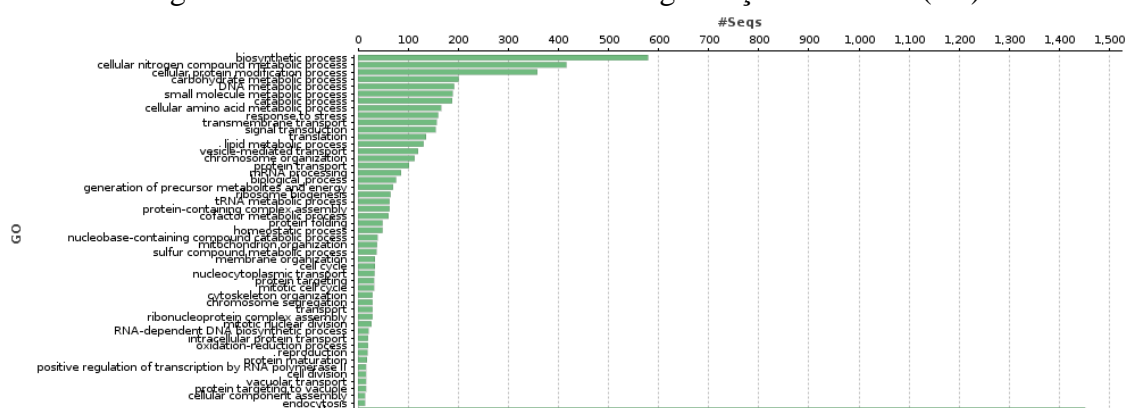


Legenda: Distribuição de termos GO nível 3 incluindo Processos Biológicos (BP) (Barras em verde), Função Molecular (MF) (Barras em azul) e Componente Celular (CC) (Barras em amarelo) entre todas as proteínas anotadas.

Fonte: Do autor (2019).

Na categoria Processo Biológico, levando em consideração o nível hierárquico 03, os termos mais representados foram “processos biossintéticos” com 579 proteínas seguido de “processos metabólicos de nitrogênio celular” com 416 e “processo de modificação de proteína celular” com 258 proteínas (FIGURA 56).

Figura 56 – Resultado da análise de categorização funcional (BP).

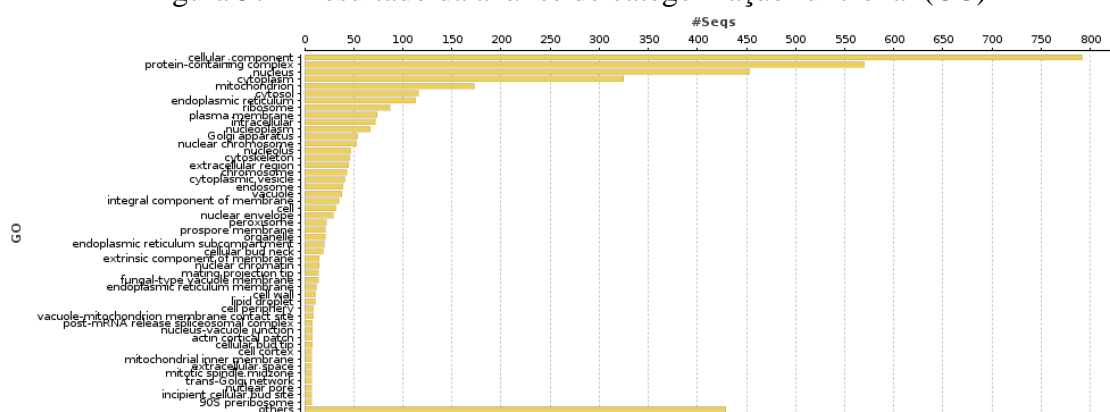


Legenda: Análise de categorização funcional das proteínas encontradas no genoma de *F. flavus* FPB-04 que apresentaram similaridade significativa. No eixo y estão os termos do GO descritos para a categoria Processo Biológico (BP), no nível hierárquico 03. No eixo x estão os números de proteínas encontradas para cada termo do GO nesta categoria.

Fonte: Do autor (2019).

Para a categoria componente celular, considerando o nível hierárquico 03, o termo mais representado foi “componente celular” com 792 proteínas, em seguida, os termos “complexo contendo proteínas” e “nucleo” com 570 e 453 proteínas, respectivamente (FIGURA 57).

Figura 57 – Resultado da análise de categorização funcional (CC)

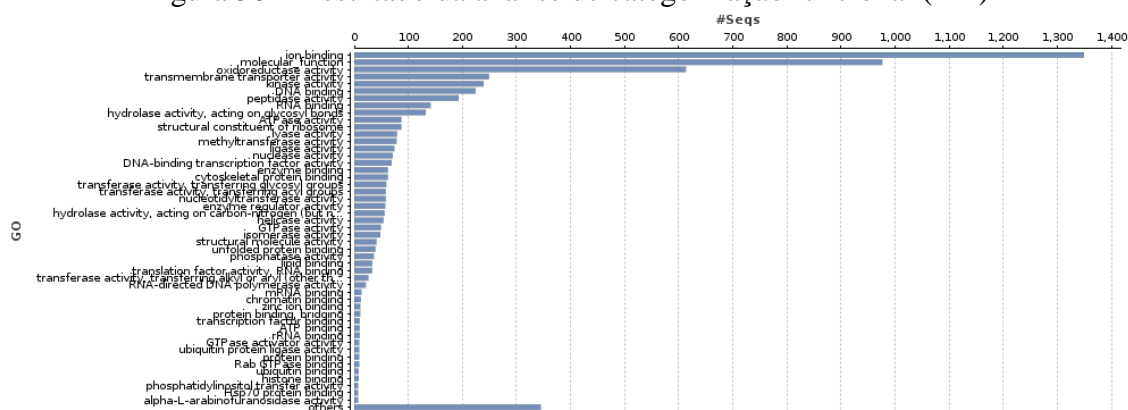


Legenda: Análise de categorização funcional das proteínas encontradas no genoma de *F. flavus* – FPB04 que apresentaram similaridade significativa. No eixo y estão os termos do GO descritos para a categoria Componente Celular (CC), no nível hierárquico 03. No eixo x estão os números de proteínas encontradas para cada termo do GO nesta categoria.

Fonte: Do autor (2019).

Considerando a categoria Função Molecular (nível hierárquico 03), os termos “ligação de íon”, “função molecular” e “atividade de oxirredutase” foram os mais representados com 1.349, 976 e 613 proteínas, respectivamente (FIGURA 58).

Figura 58 – Resultado da análise de categorização funcional (MF)

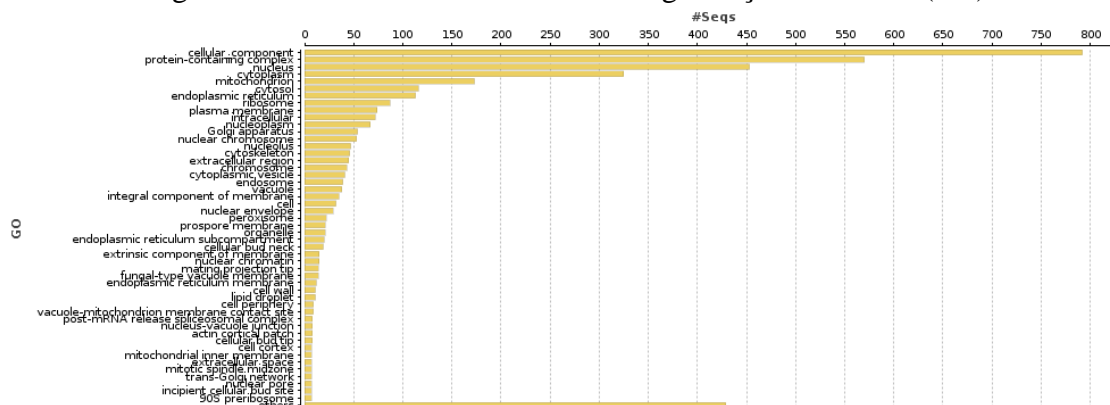


Legenda: Análise de categorização funcional das proteínas encontradas no genoma de *F. flavus* FPB-04 que apresentaram similaridade significativa. No eixo y estão os termos do GO descritos para a categoria Função Molecular (MF), no nível hierárquico 03. No eixo x estão os números de proteínas encontradas para cada termo do GO nesta categoria.

Fonte: Do autor (2019).

Para a categoria componente celular, considerando o nível hierárquico 03, o termo mais representado foi “componente celular” com 792 proteínas, em seguida, os termos “complexo contendo proteínas” e “nucleo” com 570 e 453 proteínas, respectivamente (FIGURA 59).

Figura 59 – Resultado da análise de categorização funcional (CC)



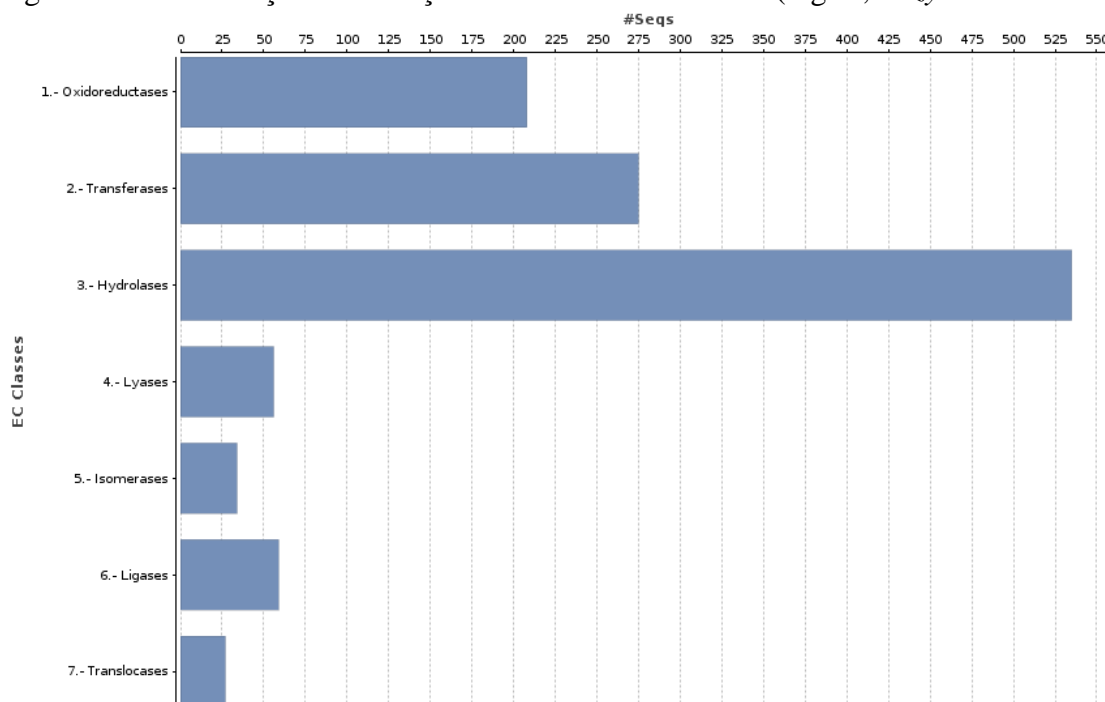
Legenda: Análise de categorização funcional das proteínas encontradas no genoma de *F. flavus* – FPB04 que apresentaram similaridade significativa. No eixo y estão os termos do GO descritos para a categoria Componente Celular (CC), no nível hierárquico 03. No eixo x estão os números de proteínas encontradas para cada termo do GO nesta categoria.

Fonte: Do autor (2019).

3.10 Códigos enzimáticos (EC)

Esses resultados foram coerentes com os códigos enzimáticos “*Enzyme codes* (EC)” obtidos (2.350), em que as classes enzimáticas mais representadas foram as hidrolases (EC 3), transferases (EC 2) e as oxirredutases (EC 1), com 535, 275 e 208 proteínas, respectivamente (FIGURA 60).

Figura 60 – Distribuição da anotação das classes enzimáticas (inglês, *Enzyme codes* - EC)



Fonte: Do autor (2019).

As hidrolases constituem importantes enzimas que atuam na quebra de polissacarídeos, principalmente as Hidrolases de glicosídeos (GHs). Ao recuperar os termos associados às regiões codificadoras de *F. flavus*, o *Blast2GO/OmicsBox* recupera o quantitativo das classes enzimáticas de um modo geral sem detalhar sua especificidade. Contudo, permitiu traçar um perfil metabólico de *F. flavus*, indicando as principais classes enzimáticas que constituem seu metabolismo.

Foram identificadas peptidases (EC 3.4) no genoma de *F. flavus* as quais possuem importante função durante a degradação de materiais de origem vegetal, pois, clivam as ligações peptídicas em proteínas da biomassa, fornecendo nitrogênio orgânico e permitindo a penetração da hifa (DA SILVA, 2017).

Em relação às transferases, as glutathione transferases (EC 2.5.1.18) catalisam o ataque nucleofílico pela glutathione reduzida (GSH) de um átomo de carbono, nitrogênio ou enxofre eletrofílico em compostos não-polares. A conjugação de GSH aos substratos eletrofílicos, promove maior solubilidade dos substratos em água. Trata-se de enzimas intracelulares presentes em diferentes compartimentos subcelulares. Possuem uma ampla especificidade de substrato e atuam na desintoxicação de vários metabólitos tóxicos endógenos estruturalmente diferentes, radicais superóxido e substâncias químicas tóxicas

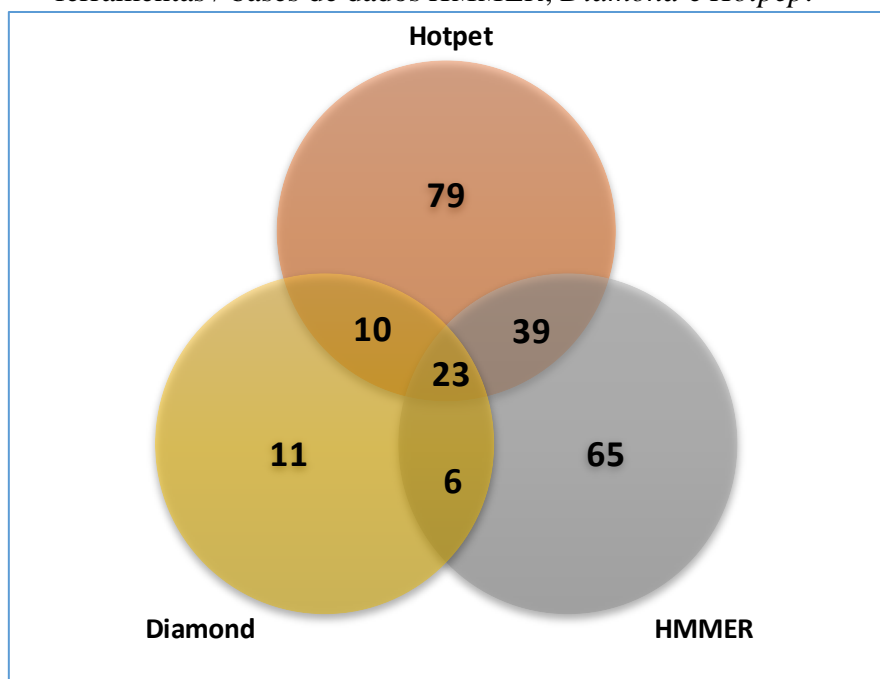
exógenas. Nos fungos, existem pelo menos oito classes distintas de GSTs (GTT1, GTT2, Ure2p, MAK16, EFb1, GSTFuA, GSTO, GHR) (KÜES, 2015).

De acordo com alguns estudos, as monoxigenases CYP450 estão relacionadas com o reconhecimento e atuação seletiva em diferentes substratos (HIROSUE et al., 2011). A partir da predição e anotação das regiões codificadoras no genoma de *F. flavus*, observou-se 159 domínios desta enzima na base *Pfam*, enquanto na base *FPrintScan* foram encontrados 103 domínios.

3.11 CAZymes presentes no genoma de *Flavodon flavus* FPB 04

No presente estudo, o genoma de *F. flavus* apresentou vários genes relacionados à quebra de carboidratos. Além disso, foram encontrados vários genes que codificam para enzimas que apresentam ação sobre a lignina (atividades auxiliares; AA) e também para módulos de ligação a carboidratos (CBM). A anotação das sequências de aminoácidos previstas dos genes de *F. flavus*, utilizando o banco de dados dbCAN CAZyme, revelou 233 CAZymes, desse total, 65 foram encontradas exclusivamente pela ferramenta HMMER, 11 pela DIAMOND e 79 com Hotpep (FIGURA 61).

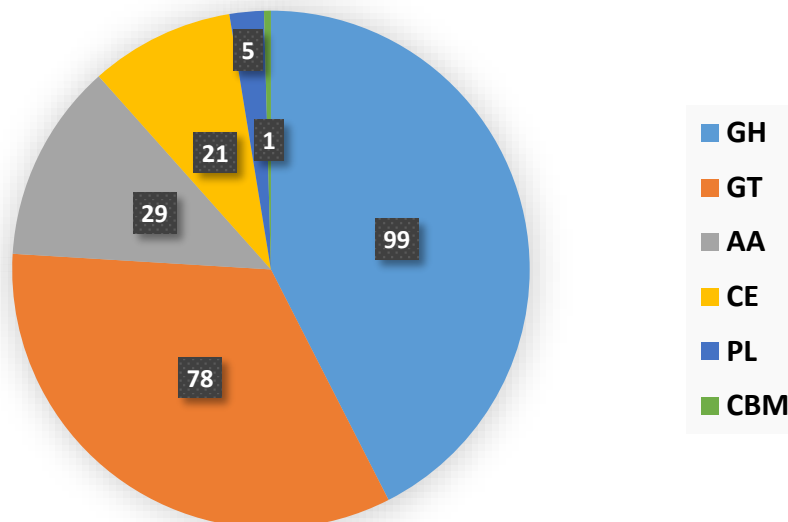
Figura 61 – Diagrama de Venn de CAZymes previstas em *F. flavus* a partir de três ferramentas / bases de dados HMMER, Diamond e Hotpep.



Fonte: Do autor (2019).

As CAZymes encontradas no genoma de *F. flavus* foram agrupadas em suas respectivas famílias conforme pode ser verificado na Figura 62.

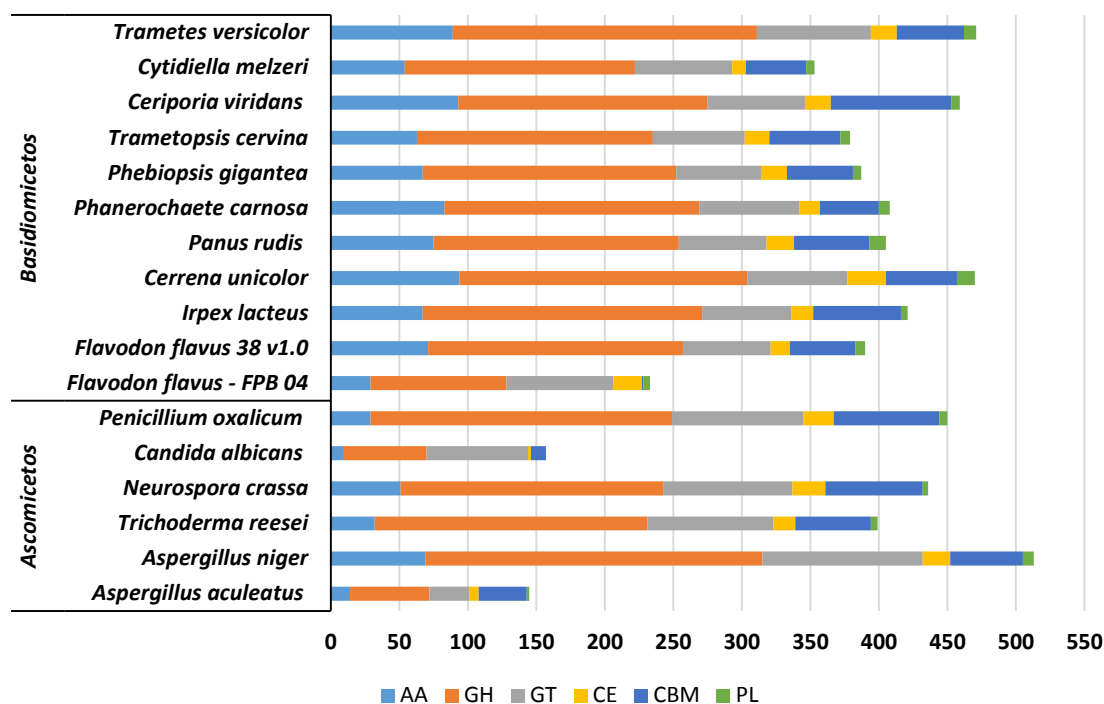
Figura 62 – Enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) do genoma de *F. flavus*.



Legenda: Glicosil-hidrolases (GH); Glicosiltransferase (GT); Atividades auxiliares (AA); Esterase de carboidrato (CE); Polissacarídeo liase (PL) e Módulo de ligação a carboidratos (CBM)
Fonte: Do autor (2019).

Adicionalmente, CAZymes anotadas de outras 16 espécies de fungos foram obtidas a partir do banco de dados JGI *Mycocosm portal* (<https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) para comparação com a anotação de *F. flavus* realizada por dbCAN2 (FIGURA 63).

Figura 63 – Enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) em *F. flavus* FPB 04 e outras espécies de fungos.



Legenda: Atividades auxiliares (AA); Módulo de ligação a carboidratos (CBM); Esterase de carboidrato (CE); Glicosil-hidrolases (GH); Glicosil-transferase (GT) e liase de polissacarídeo (PL).

Fonte: (<https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm>) (Do autor 2019).

Por meio desta análise comparativa verificou-se que o conjunto de CAZymes de *F. flavus* FPB04 é menor em relação aos demais fungos incluindo *F. flavus* anotado pelo portal JGI (38 v1.0).

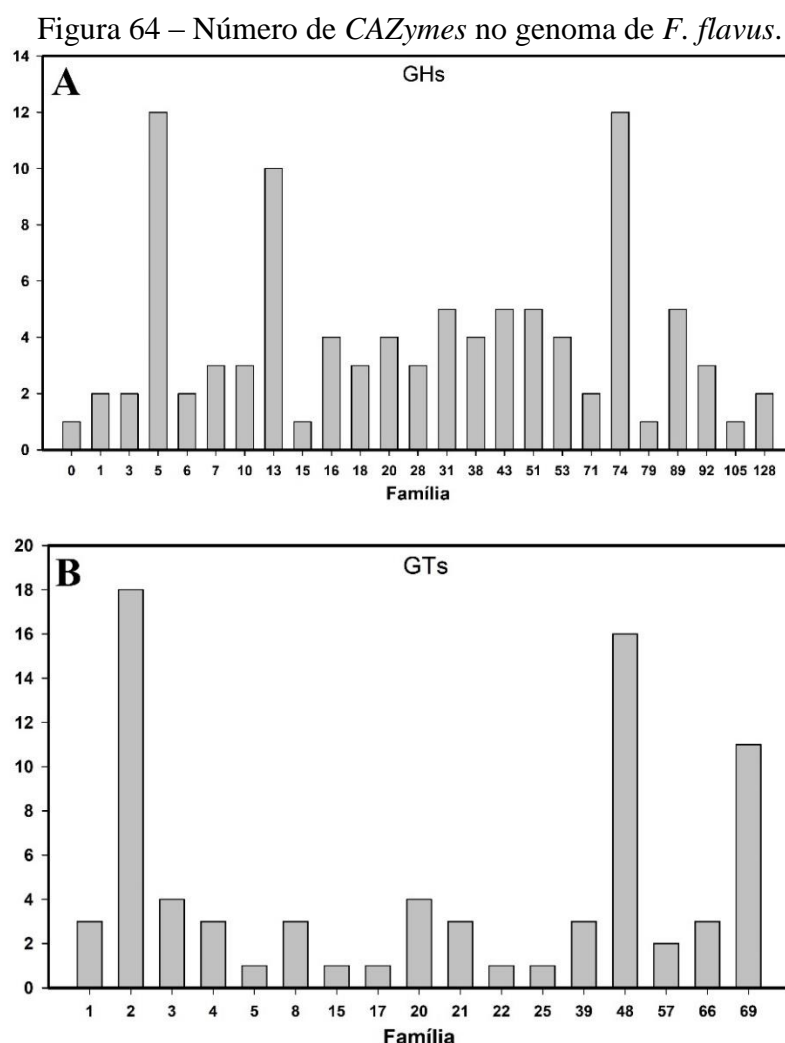
3.11.1 Hidrolases de glicosídeos (GHs)

Os fungos produzem variadas enzimas que agem principalmente sobre os carboidratos, também conhecidas como enzimas ativas de carboidratos (CAZymes). O banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>) reúne muitas informações a respeito de diferentes famílias dessas enzimas. Dentro da classe das hidrolases, temos as hidrolases de glicosídeos ou glicosil-hidrolases GHs (3.2.1-), enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas de carboidratos, são muito comuns na natureza agindo principalmente sobre o amido, a celulose e hemicelulose (BERLEMONT; MARTINY, 2016).

No presente trabalho, um total de 99 GHs classificadas em 25 famílias foram previstas no genoma de *F. flavus* por meio da busca no *dbCAN2* (FIGURA 64 A).

3.11.2 Glicosil-transferases (GTs)

As GTs (EC 2.4xy) são responsáveis por catalisar a formação de ligações glicosídicas formando glicosídeos, envolvidos na biossíntese de oligossacarídeos, polissacarídeos e glicoconjugados (LAIRSON et al., 2008; YIN et al., 2018). A anotação CAZy demonstrou 17 famílias deste grupo de enzimas presente no genoma de *F. flavus* (FIGURA 64 B).



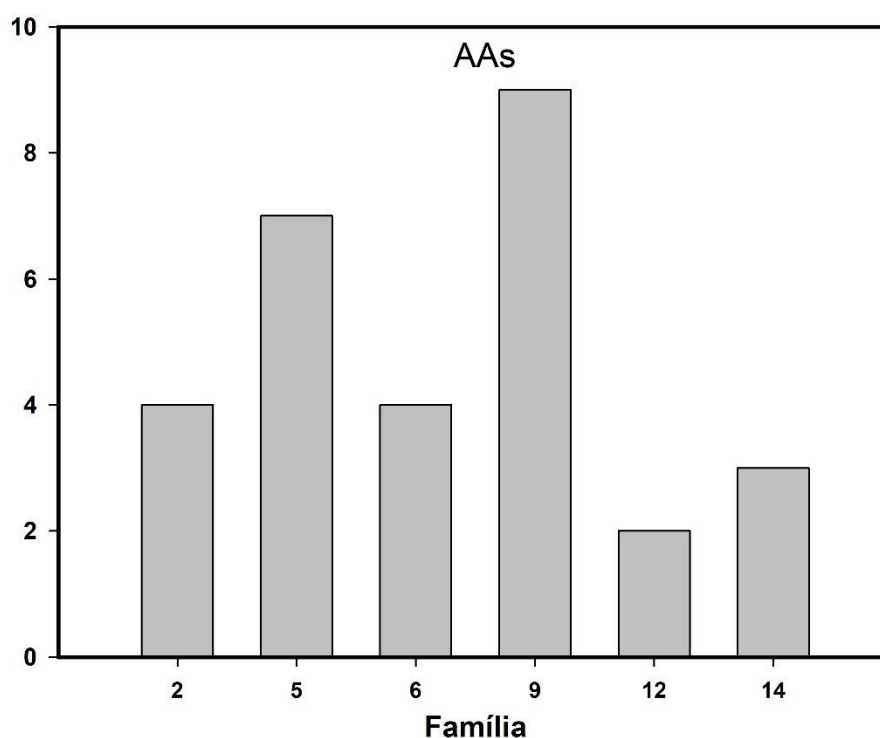
Legenda: Número de famílias (A) Glicosil-hidrolases - GHs; (B) Glicosil-transferases - GTs. Eixo x representa o número de genes de cada família de enzima.

Fonte: Do autor (2019).

3.11.3 Atividades Auxiliares (AAs)

As enzimas que agem sobre a lignina como as monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), são classificadas em famílias AA na base de dados CAZY (RYTIOJA et al., 2014). Na anotação do genoma de *F. flavus*, encontramos 29 AAs que pertencem a 6 famílias distintas (FIGURA 65).

Figura 65 – Número de CAZymes família AA no genoma de *F. flavus*.



Fonte: Do autor (2019).

A maioria das AAs deste fungo, pertencem à família AA9 (mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (LPMOs)) antes classificadas como GH61), posteriormente AAs da família AA5 que contempla as oxidativas: Oxidase com oxigênio como aceptor (EC 1.1.3.-); galactose oxidase (EC 1.1.3.9); glioxal oxidase (EC 1.2.3.15); álcool oxidase (EC 1.1.3.13). Também verificou-se membros da família AA2 que correspondem às enzimas peroxidase de manganês (EC1.11.1.13); peroxidases versáteis (EC1.11.1.16); Peroxidase de Lignina (EC1.11.1.14); Peroxidase (EC1.11.1.-).

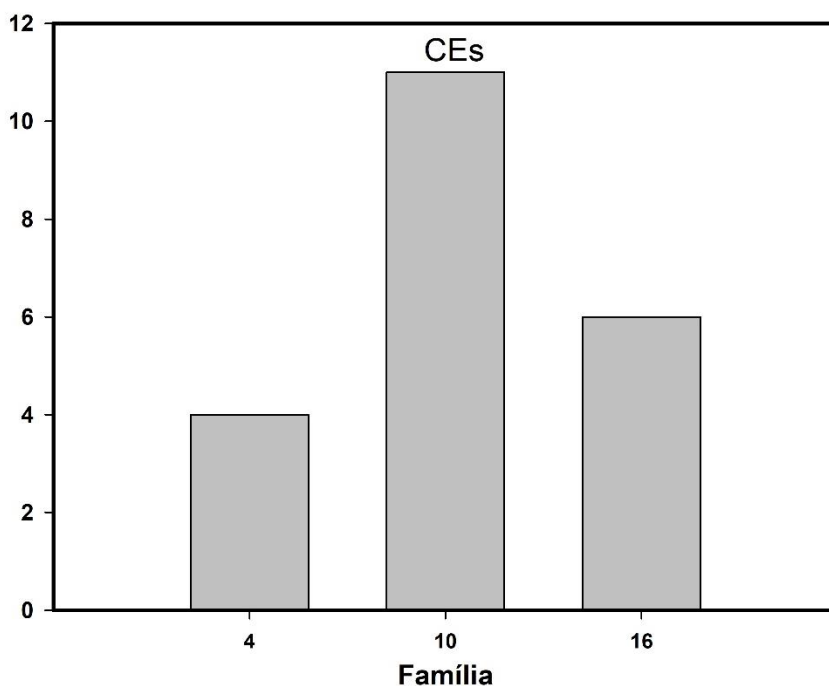
3.11.4 Módulos de ligação a carboidratos (CBMs)

Sequências de aminoácidos com atividades relacionadas a ligação a carboidratos são conhecidas como CBMs, os quais contribuem para a eficiência catalítica das CAZY uma vez que promovem a associação destas com carboidratos (BORASTON et al., 2004). No genoma de *F. flavus* foi previsto o CBM da família 21.

3.11.5 Esterases de carboidratos (CEs)

As CEs compreendem enzimas que atuam em ligações éster, utilizadas como biocatalizadores em processos biotecnológicos e industriais (BORNSCHEUER, 2002; JAEGER; EGGERT, 2002). A anotação das sequências de *F. flavus* revelou 21 CEs preditas que pertencem a 3 famílias, a maior família representada foi a CE10 (Aril esterase (EC 3.1.1.-); carboxil esterase (EC 3.1.1.3); acetil-colinesterase (EC 3.1.1.7); colinesterase (EC 3.1.1.8); esterol esterase (EC 3.1.1.13); Brefeldina A esterase (EC 3.1.1.-)) (FIGURA 66).

Figura 66 – Número de CAZymes família CE no genoma de *F. flavus*.

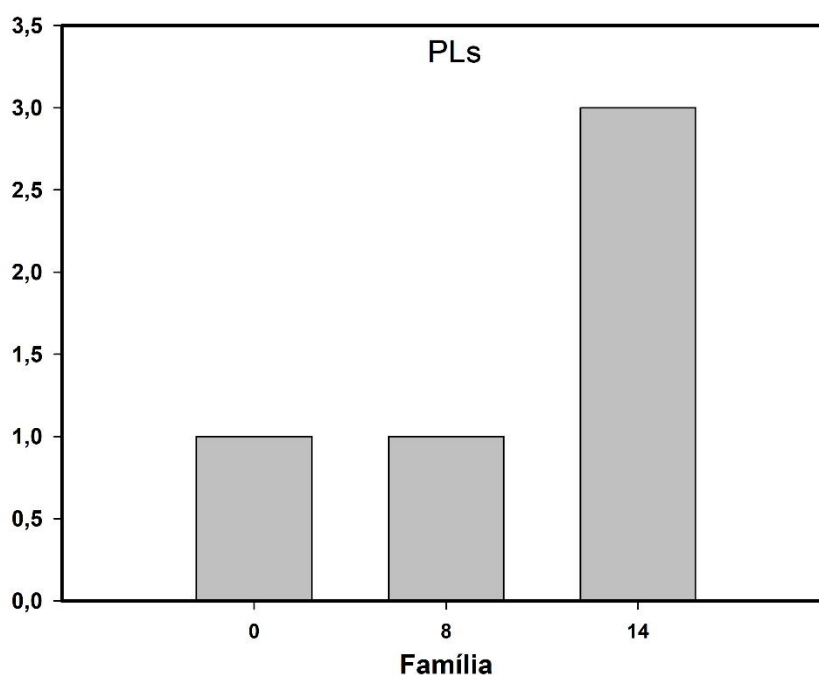


Fonte: Do autor (2019)

3.11.6 Liases de polissacarídeos (PLs)

As liases de polissacarídeos representam enzimas da classe (EC 4.2.2.-) que clivam polissacarídeos contendo ácido urônico por meio de mecanismo de retirada de ligação β , no lugar de hidrólise, produzindo polissacarídeos insaturados (YIP; WITHERS, 2006). Na anotação CAZy das sequências do genoma de *F. flavus* foram verificadas 6 PLs, 4 de famílias conhecidas (PL8 e PL14) e uma não identificada (PL0) (FIGURA 67).

Figura 67 – Número de CAZymes família PL no genoma de *F. flavus*.



Fonte: Do autor (2019).

Uma característica predominante nos fungos da podridão branca são as enzimas das famílias (CAZy AA5 e AA2) que compreendem as enzimas oxidativas (lacases entre outras) e peroxidases, respectivamente. Entre as peroxidativas as mais reportadas na literatura são aquelas que agem na despolimerização da lignina como: peroxidase de lignina (LiP; EC 1.11.1.14), peroxidase de manganês (MnP; EC 1.11.1.13) e peroxidases versáteis (VP; EC 1.11.1.16). Adicionalmente, enzimas auxiliares ajudam na degradação da lignina combinadas com as AA2, como oxidases de radical de cobre (subfamília CAZy AA5_1), oxirredutases de glicose-metanol-colina (GMC) (AA3), monoxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) (AA9), e monoxigenases do citocromo CYP450 (SUBRAMANIAN; YADAV, 2009). As lacases (AA1_1) e peroxidases de corantes

(DyP), atuam no processamento dos produtos de oxidação da lignina (MIYAUCHI et al., 2018; RILEY et al., 2014).

Os estudos genômicos com macro-basidiomicetos representam oportunidades para entendimento sobre a degradação da biomassa lignocelulósica. Por isso, tem sido aplicado a espécies que representam potencial para aplicação em bioprocessamentos consolidados (inglês, *consolidated bioprocesses* CBPs). Nesse sentido, o fungo *Flammulina elastica*, teve o genoma sequenciado revelando genes que codificam um grande repertório de enzimas lignocelulolíticas (PARK; JEONG; KONG, 2018).

A análise do genoma de *Irpex lacteus* CD2 evidenciou um conjunto de genes que codificam enzimas lignolíticas (peroxidases), enzimas auxiliares e hidrolases (QIN et al., 2018). O fungo *T. villosa* CCMB561 isolado do semiárido brasileiro, se mostrou promissor na produção de enzimas lignolíticas (peroxidase de lignina, peroxidase de manganês e lacase) incentivando o sequenciamento do seu genoma que revelou 590 genes que codificam *CAZymes* (FERREIRA et al., 2018).

Em suma, os dados obtidos com a montagem híbrida do genoma permitiram traçar um perfil do macro-basidiomiceto *F. flavus* confirmando por meio da predição de genes, que o mesmo apresenta sequências envolvidas principalmente com a produção de enzimas das classes hidrolases, transferases e oxirredutases, estas últimas, ligadas diretamente à remoção de lignina de substratos lignocelulósicos e como visto, nos capítulos anteriores (2 e 3), esta linhagem se mostrou seletiva durante o pré-tratamento do cacho vazio de dendê durante 15 dias em FES.

4 CONCLUSÃO

O sequenciamento do genoma do fungo *Flavodon flavus* linhagem FPB-04, por meio das plataformas *Pacific Biosciences (PacBio RS II)* e *Illumina (HiSeq 2500)*, permitiu uma montagem híbrida do genoma, disponibilizando assim, dados que poderão ser utilizados como referencia para o sequenciamento de outras espécies deste gênero. Além disso, vai contribuir para estudos envolvendo a desconstrução da biomassa lignocelulósica, uma vez que *F. flavus* FPB-04 revelou ser um fungo seletivo SLC, quando cultivado sobre as fibras do cacho vazio de dendê.

Neste estudo, obteve-se um conjunto de informações ainda não verificados na literatura sobre os fungos de podridão branca. Tais informações são relevantes tanto para compreensão da quebra e ou remoção da lignina de materiais lenhosos, como para descoberta de genes de enzimas hidrolíticas, lignolíticas, oxidativas e acessórias, para montagem de organismos recombinantes, por exemplo. Dessa forma, os objetivos específicos OE5 à OE10 foram parcialmente alcançados (sequenciamento de uma linhagem).

REFERÊNCIAS

- ALFARO, M. et al. Comparative and transcriptional analysis of the predicted secretome in the lignocellulose- degrading basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 12, p. 4710-4726, 2016.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: < <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> >. Acesso em: 15/01/2018.
- ANTIPOV, D. et al. hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. **Bioinformatics**, v. 32, n. 7, p. 1009-1015, 2015.
- BADOTTI, Fernanda et al. ITS and secondary biomarkers in fungi: review on the evolution of their use based on scientific publications. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 471-479, 2018.
- BALASUNDARAM, S. et al. The fungus that came in from the cold: dry rot's pre-adapted ability to invade buildings. **The ISME journal**, v. 12, n. 3, p. 791, 2018.
- BERLEMONT, R.; MARTINY, A. C. Glycoside hydrolases across environmental microbial communities. **PLoS computational biology**, v. 12, n. 12, p. e1005300, 2016.
- BECK, S. et al. Characterization of *Trametes versicolor* laccase-catalyzed degradation of estrogenic pollutants: Substrate limitation and product identification. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 127, p. 146-159, 2018.
- BINDER, M. et al. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. **Mycologia**, v. 105, n. 6, p. 1350-1373, 2013.
- BORASTON, A. B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical journal**, v. 382, n. 3, p. 769-781, 2004.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-&, 1967.
- CHEN, L. et al. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160336, 2016.
- COCK, P. J. et al. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/*Illumina* FASTQ variants. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 6, p. 1767-1771, 2009.

CONESA, A. et al. *Blast2GO/OmicsBox* : a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomiCST research. **BioinformatiCST**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

DA SILVA, R. R. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 183, n. 1, p. 1-19, 2017.

DE VRIES, R. P.; GRIGORIEV, I. V.; TSANG, A. Introduction: Overview of Fungal GenomiCST. In: (Ed.). **Fungal GenomiCST**: Springer, 2018. p.1-7.

ERLICH, Y. et al. Alta-Cyclic: a self-optimizing base caller for next-generation sequencing. **Nature methods**, v. 5, n. 8, p. 679, 2008.

FERNANDEZ-FUEYO, E. et al. Comparative genomiCST of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5458-5463, 2012.

FERREIRA, D. S. S. et al. Draft genome sequence of *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel CCMB561, a tropical white-rot Basidiomycota from the semiarid region of Brazil. **Data in brief**, v. 18, p. 1581-1587, 2018.

FINN, R. D. et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D190-D199, 2016.

FLOUDAS, D. et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1715-1719, 2012.

FLOUDAS, D. et al. Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. **Fungal GenetiCST and Biology**, v. 76, p. 78-92, 2015.

GARCÍA-TORREIRO, M. et al. Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 486-492, 2016.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.

GRANCHI, Z. et al. Genome Sequence of the Basidiomycete White-Rot Fungus *Trametes pubescens* FBCC735. **Genome Announc.**, v. 5, n. 8, p. e01643-16, 2017.

GUO, R. et al. Gene Prediction Based On a Generalized Hidden Markov Model and Some Statistical Models of Related States: a Review. *The International Conference on Biological Sciences and Technology*, 2016. Atlantis Press.

GUPTA, D. K. et al. The genome sequence of the commercially cultivated mushroom *Agrocybe aegerita* reveals a conserved repertoire of fruiting-related genes and a versatile suite of biopolymer-degrading enzymes. **BMC genomiCST**, v. 19, n. 1, p. 48, 2018.

- GUREVICH, A. et al. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. **BioinformaticST**, v. 29, n. 8, p. 1072-1075, 2013.
- HANSEN, K. D.; BRENNER, S. E.; DUDOIT, S. Biases in *Illumina* transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 12, p. e131-e131, 2010.
- HIROSUE, S. et al. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 407, n. 1, p. 118-123, 2011.
- HOFF, K. J.; STANKE, M. WebAUGUSTUS—a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes. **Nucleic acids research**, v. 41, n. W1, p. W123-W128, 2013.
- HUANG, C. et al. Transcriptome analysis reveals novel insights into the response to Pb exposure in *Phanerochaete chrysosporium*. **Chemosphere**, v. 194, p. 657-665, 2018.
- JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.
- JIANG, L. et al. Synthetic spike-in standards for RNA-seq experiments. **Genome research**, 2011.
- JUSTO, A. et al. A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). **Fungal Biology**, v. 121, n. 9, p. 798-824, 2017.
- JURAK, E. et al. DynamiCST of the *Phanerochaete carnosae* transcriptome during growth on aspen and spruce. **BMC genomiCST**, v. 19, n. 1, p. 815, 2018.
- KALVARI, I. et al. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D335-D342, 2017.
- KALVARI, I. et al. Non- Coding RNA Analysis Using the Rfam Database. **Current protocols in bioinformaticST**, p. e51, 2018.
- KAMADA, T. et al. Regulation of fruiting body photomorphogenesis in *Coprinopsis cinerea*. **Fungal GenetiCST and Biology**, v. 47, n. 11, p. 917-921, 2010.
- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.
- KÄRHÄ, K. et al. Treatment of *Picea abies* and *Pinus sylvestris* Stumps with Urea and *Phlebiopsis gigantea* for Control of Heterobasidion. **Forests**, v. 9, n. 3, p. 139, 2018.
- KIYAMA, R. et al. Genome sequence of the cauliflower mushroom *Sparassis crispa* (Hanabiratake) and its association with beneficial usage. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 16053, 2018.

KOHLER, A. et al. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. **Nature genetics**, v. 47, n. 4, p. 410, 2015.

KRUEGER, F. Trim Galore: A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files, with some extra functionality for MspI-digested RRBS-type (Reduced Representation Bisulfite-Seq) libraries., 2012. Disponível em: <
https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/>. Acesso em: 15/01/2018.

KÜES, U. Fungal enzymes for environmental management. **Current opinion in biotechnology**, v. 33, p. 268-278, 2015.

KUUSKERI, J. et al. Time-scale dynamics of proteome and transcriptome of the white-rot fungus *Phlebia radiata*: growth on spruce wood and decay effect on lignocellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 192, 2016.

LAIRSON, L. et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. **Annual review of biochemistry**, v. 77, 2008.

LI, H. et al. The genome sequences of 90 mushrooms. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9982, 2018.

LIERS, C. et al. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood-and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. **FEMS microbiology ecology**, v. 78, n. 1, p. 91-102, 2011.

MÄKELÄ, M. R. et al. Draft Genome Sequence of the Basidiomycete White-Rot Fungus *Phlebia centrifuga*. **Genome Announc.**, v. 6, n. 14, p. e01414-17, 2018.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. **Current microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485-498, 2015.

MARTIN, F. et al. Sequencing the fungal tree of life. **New Phytologist**, v. 190, n. 4, p. 818-821, 2011.

MARTINEZ, D. et al. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1954-1959, 2009.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 695, 2004.

MIETTINEN, O. et al. Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores (Polyporales, Basidiomycota). **Cladistics**, v. 28, n. 3, p. 251-270, 2012.

MIETTINEN, O. et al. Draft genome sequence of the white-rot fungus *Obba rivulosa* 3A-2. **Genome Announc.**, v. 4, n. 5, p. e00976-16, 2016.

- MIYAUCHI, S. et al. Integrative visual omiCST of the white-rot fungus *Polyporus brumalis* exposes the biotechnological potential of its oxidative enzymes for delignifying raw plant biomass. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 201, 2018.
- MTUI, G.; NAKAMURA, Y. Lignocellulosic enzymes from *Flavodon flavus*, a fungus isolated from Western Indian Ocean off the coast of Dar es Salaam, Tanzania. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 17, 2008.
- MUJIC, A. B. et al. Comparative genomiCST of the ectomycorrhizal sister species *Rhizopogon vinicolor* and *Rhizopogon vesiculosus* (Basidiomycota: Boletales) reveals a divergence of the mating type B locus. **G3: Genes, Genomes, GenetiCST**, v. 7, n. 6, p. 1775-1789, 2017.
- MUSSATTO, S. I. **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Elsevier, 2016. ISBN 0128025611.
- NAGARAJAN, N.; POP, M. Sequence assembly demystified. **Nature Reviews GenetiCST**, v. 14, n. 3, p. 157, 2013.
- NAGY, L. G. et al. Comparative genomiCST of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 4, p. 959-970, 2015.
- NAWROCKI, E. P. et al. Rfam 12.0: updates to the RNA families database. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D130-D137, 2014.
- NAZARPOUR, F. et al. Evaluation of biological pretreatment of rubberwood with white rot fungi for enzymatic hydrolysis. **Materials**, v. 6, n. 5, p. 2059-2073, 2013.
- OHM, R. A. et al. Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. **Molecular microbiology**, v. 81, n. 6, p. 1433-1445, 2011.
- OHM, R. A. et al. GenomiCST of wood-degrading fungi. **Fungal GenetiCST and Biology**, v. 72, p. 82-90, 2014.
- PALMER, G. E.; HORTON, J. S. Mushrooms by magic: making connections between signal transduction and fruiting body development in the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*. **FEMS microbiology letters**, v. 262, n. 1, p. 1-8, 2006.
- PARK, S.-G. et al. Long-read transcriptome data for improved gene prediction in *Lentinula edodes*. **Data in brief**, v. 15, p. 454-458, 2017.
- PARK, Y.-J.; JEONG, Y.-U.; KONG, W.-S. Genome Sequencing and Carbohydrate-Active Enzyme (CAZyme) Repertoire of the White Rot Fungus *Flammulina elastica*. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2379, 2018.
- QIN, X. et al. Deciphering lignocellulose deconstruction by the white rot fungus *Irpex lacteus* based on genomic and transcriptomic analyses. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 58, 2018.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.

RAGHUKUMAR, C. et al. Lignin-modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 5, p. 2103-2111, 1999.

RILEY, R. et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9923-9928, 2014.

RYTIOJA, J. et al. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with *Phlebia brevispora* NRRL- 13108 for enhanced enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 2, p. 365-374, 2017.

SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SCHOCH, Conrad L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SIMMONS, D. R. et al. *Flavodon ambrosius* sp. nov., a basidiomycetous mycosymbiont of *Ambrosiodmus ambrosia* beetles. **Mycotaxon**, v. 131, n. 2, p. 277-285, 2016.

SPIRIN, W. *Antrodiella romellii* (Irpicaceae, Basidiomycetes) in Russia. **Mycena**, v. 3, p. 48-52, 2003.

STAJICH, J. E. Fungal Genomes and Insights into the Evolution of the Kingdom. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.

SUBRAMANIAN, V.; YADAV, J. S. Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 17, p. 5570-5580, 2009.

SUZUKI, H. et al. Comparative genomiCST of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosae* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. **BMC genomiCST**, v. 13, n. 1, p. 444, 2012.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular biology and evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic analysis. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.
- XU, J. Fungal DNA barcoding. **Genome**, v. 59, n. 11, p. 913-932, 2016.
- YAN, L. et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 9, p. 1131, 2013.
- YANG, R.-H. et al. The genome of *Pleurotus eryngii* provides insights into the mechanisms of wood decay. **Journal of biotechnology**, v. 239, p. 65-67, 2016.
- YANG, S. et al. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review. **Bioresource technology**, v. 141, p. 97-108, 2013.
- YIN, Y. et al. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic acids research**, v. 40, n. W1, p. W445-W451, 2012.
- YIN, Y. et al. Glycosyltransferases of the GT8 family. **Annual Plant Reviews online**, p. 167-211, 2018.
- YIP, V. L.; WITHERS, S. G. Breakdown of oligosaccharides by the process of elimination. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 147-155, 2006.
- ZHANG, H. et al. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W95-W101, 2018.
- ZIMIN, A. V. et al. The MaSuRCA genome assembler. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2669-2677, 2013.

**CAPÍTULO 5 – Sequenciamento, montagem e anotação funcional *de novo* do
genoma de *Fomes fasciatus* FPB-28**

RESUMO

O aproveitamento integral dos constituintes da lignocelulose são limitados em função da recalcitrância ocasionada em parte, pela lignina sendo necessário o emprego de pré-tratamentos para desconstrução estrutural, seguido de hidrólise enzimática para liberar os açúcares fermentescíveis. Neste contexto, a ordem *Poliporales* inclui um grande número de fungos de podridão branca com potencial lignocelulolítico entre os quais se encontra o gênero *Fomes* spp. Por meio de uma triagem identificamos uma linhagem de *Fomes fasciatus* FPB-28, isolado do bioma cerrado que quando cultivado sobre o CVD, uma biomassa abundante proveniente da agroindústria de óleo de palma (*Elaeis* spp.), produziu um EBE com atividade de lacase e peroxidase. Este extrato também conferiu efeito sinérgico em misturas enzimáticas, levando à redução de compostos fenólicos. Além disso, o cultivo deste fungo nesse substrato, indicou seletividade SLC sobre a lignina. Até o momento, não está disponível nenhuma informação sobre o genoma de *F. fasciatus*, apesar disso, o genoma da espécie de mesmo gênero *F. fomentarius*, foi sequenciado em 2017 e as informações estão disponibilizadas no portal *MycCosm*. Assim, objetivou-se neste capítulo o sequenciamento, montagem e anotação (estrutural e funcional) do genoma de *F. fasciatus* FPB-28. Empregando-se as plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS), *Pacific Biosciences* (*PacBio RS II*) e *Illumina* (*HiSeq 2500*) e uma estratégia de montagem híbrida com o MaSuRCA, obteve-se 49.08 Mb do genoma deste fungo. Foram encontradas 13.737 regiões codificadoras. Análises de similaridade entre as proteínas preditas no genoma de *F. fasciatus* e as sequências de proteínas de outros fungos, depositadas nos bancos de dados públicos, evidenciaram 77,78 % de *hits* com fungos da ordem *Poliporales*, principalmente, *Dichomitus squalens*, *Trametes versicolor* e *Sparassis crispa*. De acordo com a análise de categorização funcional, o genoma de *F. fasciatus* FPB-28 mostrou um grande número de enzimas hidrolases, transferases e oxidoredutases e anotação de *CAZymes* revelou a presença de 330 genes que codificam importantes famílias de enzimas desconstrutoras da lignocelulose. De modo geral os dados serão úteis como referência para o sequenciamento de espécies relacionadas. Além disso, vão contribuir com os estudos sobre a desconstrução da biomassa lignocelulósica e redução de interferentes da hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Sequenciamento de nova geração. Predição de genes. PacBio. CAZymes.

ABSTRACT

The full utilization of lignocellulose constituents is limited due to the recalcitrance caused in part by lignin and the use of pretreatment for structural deconstruction, followed by enzymatic hydrolysis to release fermentable sugars. In this context, the order Polyporales includes a large number of white-rot fungi with lignocellulolytic potential, among which is the genus *Fomes* spp. By screening, we identified a strain of *Fomes fasciatus* FPB-28, isolated from the Cerrado biome that when grown on CVD, an abundant biomass from the palm oil agribusiness (*Elaeis* spp.), produced an EBE with laccase activity and peroxidase. This extract also conferred the synergistic effect on enzymatic mixtures, leading to the reduction of phenolic compounds. Also, the cultivation of this fungus on this substrate indicated SLC selectivity on lignin. At present, no information on the genome of *F. fasciatus* is available, although the genome of the same species *F. fomentarius* was sequenced in 2017 and the information is available on the *Mycocosm* portal. Thus, the objective of this chapter was the sequencing, assembly, and annotation (structural and functional) of the *F. fasciatus* FPB-28 genome. Using the next-generation sequencing platforms (NGS), Pacific Biosciences (PacBio RS II) and Illumina (HiSeq 2500) and a hybrid assembly strategy with MaSuRCA, 49.08 Mb of the genome of this fungus was obtained. 13,737 coding regions were found. Similarity analyzes between the proteins predicted in the *F. fasciatus* genome and the protein sequences of other fungi, deposited in public databases, showed 77.78% of hits with Polyporales fungi, mainly *Dichomitus squalens*, *Trametes versicolor*, and *Sparassis crispa*. According to the functional categorization analysis, the *F. fasciatus* FPB-28 genome showed a large number of hydrolases, transferases and oxidoreductase enzymes and CAZymes annotation revealed the presence of 330 genes encoding important lignocellulose deconstructing enzyme families. In general, the data will be useful as a reference for sequencing related species. Also, they will contribute to studies on the deconstruction of lignocellulosic biomass and the reduction of enzymatic hydrolysis interferers.

Keywords: New generation sequencing. Prediction of genes. PacBio. CAZymes

1 INTRODUÇÃO

Os fungos macro-basidiomicetos apresentam a capacidade de desconstruir substratos lignocelulósicos em função da eficiência de seu sistema enzimático, principalmente devido a produção de enzimas lignolíticas (lacases e peroxidases). Em função disto, são considerados modelos biotecnológicos para aplicação em bioprocessamentos consolidados (CBP), principalmente, em biorrefinarias (DASHTBAN et al., 2010; ELISASHVILI et al., 2016; KUMAR et al., 2018).

Entre as limitações na obtenção de produtos de valor agregado a partir da lignocelulose, está a recalcitrância ocasionada pela lignina, um polímero aromático que confere resistência e proteção aos vegetais (MUSSATTO, 2016). Nesse sentido, a utilização de pré-tratamento para desconstrução parcial da biomassa é necessária, garantindo o sucesso das etapas subsequentes como a hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis a etanol (HSU, 2018; MOOD et al., 2013), produção de biogás (ZHENG et al., 2014), químicos e polímeros (OH et al., 2015; TAPIA-BLÁCIDO; MANIGLIA; MARTELLI- TOSI, 2017).

Nesse contexto, a agroindústria do óleo de palma (*Elaeis spp.*) durante seus processos de obtenção dos produtos (óleo de palma cru e óleo de palmiste), gera também muitos resíduos lignocelulósicos. Assim, a Embrapa Agroenergia vem desenvolvendo pesquisas de modo a encontrar alternativas para agregar valor a estes materiais.

Os macro-basidiomicetos possuem diversas aplicações. Eles podem ser utilizados como alternativa na desconstrução parcial da biomassa, enriquecimento proteico de fibras para alimentação animal e também como agentes doadores de enzimas para hidrólise em plataformas no modelo de biorrefinarias. Assim, o uso de macro-basidiomicetos apresenta vantagens em relação a alguns métodos de pré-tratamento a altas temperaturas. Isso porque tais métodos apresentam desvantagens como alto gasto energético, formação de inibidores e geração de efluentes (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Dessa forma, muitos estudos surgiram buscando identificar linhagens fúngicas promissoras com a finalidade de aplicação no tratamento de diversos resíduos agroindustriais (CASTOLDI et al., 2014; HERMOSILLA et al., 2018; LÓPEZ-ABELAIRAS et al., 2013; SAHA et al., 2016; SHAH; ULLAH, 2019). Paralelamente, nos últimos anos houve rápida expansão e acesso facilitado às tecnologias genômicas, como o sequenciamento completo do genoma. Por isso, várias espécies de macro-

basidiomicetos, notadamente produtoras de enzimas e desconstrutoras da lignocelulose, tiveram seus genomas sequenciados, revelando os mecanismos utilizados durante a degradação da madeira (CHEN et al., 2016; MIETTINEN et al., 2016; OHM et al., 2014; YAO et al., 2017).

A partir do exposto, objetivou-se com o presente trabalho o sequenciamento e anotação estrutural e funcional do genoma do macro-basidiomiceto *Fomes fasciatus* linhagem FPB-28, isolada do cerrado brasileiro. Esse fungo se mostrou promissor na produção de extratos enzimáticos, para emprego em coquetéis enzimáticos e hidrólise do cacho vazio de dendê, além de contribuir na redução da lignina, quando cultivado nesse substrato. Dessa forma, o estudo genômico deste macro-basidiomiceto se mostrou importante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

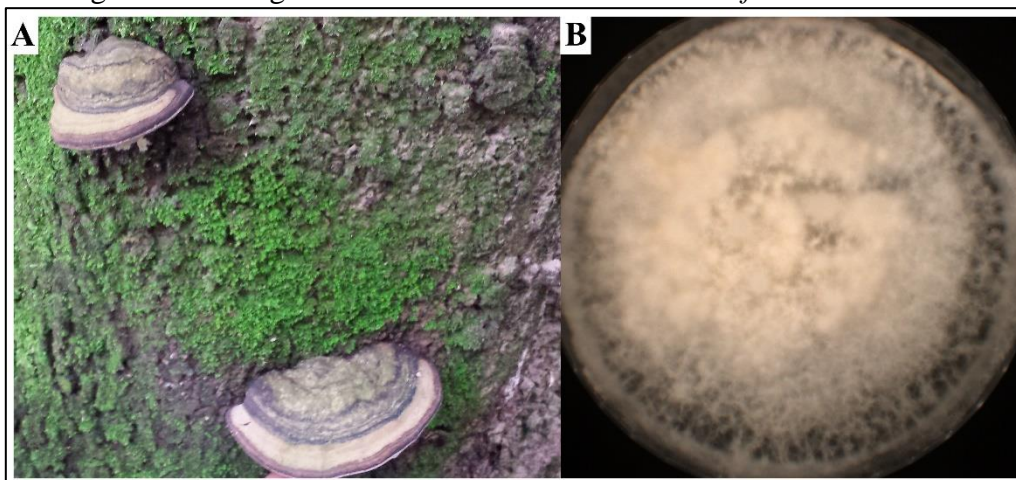
2.1 Construção de árvore filogenética

Para construção da árvore filogenética, utilizou-se os dados da região ITS do rDNA da linhagem *Fomes fasciatus* FPB-28 obtidos com a estimativa taxonômica do capítulo 4. Também, utilizou-se sequências desta região de outras espécies da ordem *Polyporales*, disponíveis no banco de dados *GenBank*. Posteriormente, foram realizados alinhamentos utilizando o software Geneious (versão R11), com o modelo de distância genética Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993) e método de construção de árvore Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987).

2.2 Linhagem fúngica, condições de cultivo e obtenção de micélio

O basidiomiceto *Fomes fasciatus* isolado do cerrado brasileiro, foi cultivado em placas de petri contendo meio BDA e mantido em câmara fria a 4 °C (FIGURA 95 A-B).

Figura 68 – Imagem do macro-basidiomiceto *Fomes fasciatus* FPB-28.



Legenda: (A) corpo de frutificação do Basidiomiceto *F. fasciatus* FPB-28 em tronco de árvore e (B) crescimento in vitro sobre o meio BDA.

Fonte: Embrapa Agroenergia.

Adicionalmente, discos de Ø 7mm do micélio foram armazenados em criotubos de 2 mL com água destilada autoclavada (CASTELLANI, 1967) em temperatura ambiente. Para obtenção do DNA genômico, o fungo foi cultivado em meio líquido caldo de batata (KASVI®) e extrato de malte (20 g L⁻¹) (Sigma-Aldrich®).

Os cultivos foram realizados em frascos *erlenmeyers* de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultura. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C, 1 atm durante 30 minutos. Após resfriamento do meio, empregou-se 10 discos miceliais Ø 7 mm do fungo em cada frasco. Posteriormente, foram mantidos em *shaker* de bancada a 28°C e 128 rpm durante 10 dias para obtenção de micélios. Decorrido o tempo de cultivo, os micélios foram obtidos por meio de filtração e o meio de cultivo remanescente foi removido através de lavagem com água ultrapura estéril. Os micélios foram triturados em almofariz com pistilo e nitrogênio líquido. Finalmente, cerca de 100 mg do macerado foi capturado em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, mantidos em nitrogênio e armazenados em ultrafreezer a - 80 °C até o momento das extrações.

2.3 Obtenção do DNA genômico

Para isolamento de DNA genômico, ao macerado obtido adicionou-se 700 µL de tampão CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0, NaCl 2 M, polivinilpirrolidona – PVP 2,5%) e 0,2 µL de β-mercaptoetanol obtendo-se uma concentração final de 0,2%. A incubação ocorreu durante 40 minutos e os tubos foram agitados vigorosamente a cada 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação, adicionou-se 700 µL da solução de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 (CIA), agitou-se vigorosamente e os tubos foram deixados em posição horizontal em capela de exaustão por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C e a fase superior foi coletada.

Em seguida, adicionou-se 1,5 µL de RNase A (Thermo ®) nos sobrenadantes coletados e os tubos foram incubados a 37°C durante 40 minutos em banho seco. Adicionou-se então, 0,6 volumes de isopropanol e armazenou-se em freezer a -20 °C durante 2 horas. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante descartado cuidadosamente. O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 100% e posteriormente com 1 mL de etanol 70 %. Após secagem, os *pellets* foram ressuspensos em tampão TE (EDTA 1mM pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0) e a qualidade e integridade do DNA obtido foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop e gel de agarose 1%.

2.4 Preparo das bibliotecas e sequenciamento na plataforma *Illumina*

As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa Genone (<http://www.genone.com.br/>). Após avaliação da qualidade, o DNA foi fragmentado por enzima de restrição. A construção das bibliotecas de DNA ocorreu por meio dos processos de reparo final havendo a adição de adaptadores nas extremidades, purificação e amplificação por PCR. As bibliotecas foram sequenciadas por sequenciador *Illumina* de alto rendimento empregando-se a estratégia *paired-end*.

As sequências geradas (*reads* brutos), foram filtradas eliminando aquelas contendo adaptadores, *reads* contendo $N > 10\%$ e *reads* com baixa qualidade ($Q_{score} \leq 5$) (ERLICH et al., 2008; HANSEN; BRENNER; DUDOIT, 2010; JIANG et al., 2011; YAN et al., 2013). Os dados brutos obtidos foram então registrados em 2 arquivos FASTQ, um contendo a orientação *forward* dos fragmentos sequenciados e outro com a orientação *reverse* (COCK et al., 2009).

2.5 Preparo das bibliotecas e sequenciamento na plataforma *PacBio*

Amostras do DNA obtido, nos mesmos moldes citados anteriormente (2.2), foram enviadas para sequenciamento *PacBio* pela empresa Uniscience (<http://uniscience.com.br/>). As construções das bibliotecas ocorreram de acordo com as instruções do kit *PacBio Library Preparation*[®].

2.6 Análises de qualidade das sequências obtidas com a plataforma *Illumina*

O controle de qualidade das sequências foi realizado utilizando FastQC (versão 0.11.7) para verificar a presença de possíveis contaminantes, baixa qualidade de leitura e artefatos de PCR, conteúdo de GC, presença de adaptadores e *k-mers* super-representados (ANDREWS, 2010). Adicionalmente realizou-se a trimagem das sequências para remoção de nucleotídeos com baixa qualidade no final das sequências e adaptadores (KRUEGER, 2012).

2.7 Montagem híbrida do genoma de *Fomes fasciatus*

Empregou-se uma estratégia de montagem híbrida utilizando o MaSuRCA (ZIMIN et al., 2013) combinando-se leituras curtas obtidas por *Illumina (short-read)* e leituras de maior comprimento obtidas pela tecnologia *PacBio (long-read)* (ANTIPOV et al., 2015) *k-mers* (21, 33, 55, 77, 99 e 127). A qualidade da montagem, antes e após trimagem, foi avaliada (GUREVICH et al., 2013).

2.8 Anotação estrutural e predição de genes

Foi realizada a anotação estrutural do genoma, a fim de prever genes presentes no genoma de *F. fasciatus*. Para realizar a predição *ab initio*, foi utilizado o software *Blast2GO/OmicsBox* (versão 5.2) (CONESA et al., 2005) que contém o algoritmo *Augustus* (versão 3.0.3) (HOFF; STANKE, 2013) (*genefind > Eukaryotic GeneFinding*). Para identificar genes com maior precisão, *Phanerochaete chrysosporium* (Poliporales) foi escolhido como gênero relacionado. Foram realizadas buscas por genes completos em ambas as cadeias para obtenção do número de proteínas.

2.9 Anotação Funcional

Utilizando o software *Blast2GO/OmicsBox*, por meio do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990), foi realizada uma busca por similaridade entre as sequências de proteínas encontradas no genoma de *F. fasciatus* contra o banco de dados de proteínas não redundante (nr) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Posteriormente foi realizada a anotação com *InterProScan* a fim de recuperar informações de domínio/motivos de maneira sequencial. Os termos GO correspondentes foram transferidos para as sequências e mesclados com os termos GO existentes.

A próxima estratégia consistiu no mapeamento de ontologia genética (inglês, GO) e recuperação dos termos GO associados aos *hits* obtidos pela pesquisa do BLAST. Foram realizadas 4 etapas de mapeamento distintas. Na etapa 1 os acessos obtidos com o BLAST foram usados para recuperar nomes de genes ou símbolos, empregando-se dois arquivos de mapeamento fornecidos pelo NCBI (*gene_info*, *gene2accession*). Os nomes dos genes identificados foram pesquisados do banco de dados do Gene Ontology.

Na etapa 2, as identidades (IDs) principais do BLAST foram utilizadas para recuperar IDs UniProt (*Universal Protein Resource*) por meio de um arquivo de mapeamento de PIR (*Non-redundant Reference Protein Database*) incluindo PSD, UniProt, Swiss-Prot, TrEMBL, RefSeq, GenPept e PDB. Na etapa 3, os acessos foram pesquisados diretamente na tabela *dbxref* da base de dados do GO e finalmente, na etapa 4 foi realizada uma pesquisa na Tabela de produtos gênicos da base GO empregando-se os acessos do BLAST.

Então, procedeu-se com a anotação funcional onde os termos GO foram selecionados do *pool* GO obtido anteriormente e atribuídos às sequências de consulta. A regra de anotação (inglês, AR) empregada no *Blast2GO/OmicsBox* busca encontrar anotações mais específicas com certo nível de confiabilidade. Para cada candidato, uma pontuação de anotação (inglês, AS) foi calculada. O AS é composto por dois termos aditivos, o primeiro, termo direto (inglês, DT), refere-se a maior similaridade de acertos deste GO ponderado por um fato correspondente ao EC (1).

O segundo termo (AT) do AS forneceu a possibilidade de abstração. Isso foi definido como uma anotação para um nó pai (*parent node*) quando vários nós filhos (*children node*) estiveram presentes na coleção de candidatos GO (2). Este termo então multiplica o número total de GO unificados no nó por um fator de peso GO definido previamente. Finalmente, o AR seleciona o menor termo por ramificação que fica acima de um limite definido (3). DT, AT e os termos AR são definidos da seguinte forma:

$$DT = \max (similarity \times EC \ weight) \quad (1)$$

$$AT = (\#GO-1) \times GO \ weight \quad (2)$$

$$AR: \textit{lowest.node} (AS (DT+AT)) \geq \textit{threshold} \quad (3)$$

As sequências de proteínas de *F. fasciatus* com similaridade significativa com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados, foram analisadas quanto à sua categorização funcional (processo biológico, função molecular e componente celular) por meio do *Gene Ontology* (GO).

Figuras obtidas no *software Blast2GO/OmicsBox* apresentam informações em inglês, não permitindo sua modificação. A fim de facilitar a leitura e compreensão, os principais resultados encontram-se descritos no texto que as antecede.

2.9.1 Códigos Enzimáticos (EC)

A busca por códigos de enzimas (inglês, EC) foi realizada também no *software* através de busca na base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KANEHISA; GOTO, 2000) permitindo a obtenção de “*Kegg Maps*”, e visualização de vias metabólicas em que a(s) sequência(s) ou seu(s) produto(s) atua(m).

2.9.2 Identificação de enzimas ativas de carboidratos *CAZymes*

Os genes associados a hidrolases de glicosídeos ou glicosil-hidrolases (GHs), esterases de carboidratos (CEs), liases de polissacarídeos (PLs), glicosiltransferases (GTs), atividades auxiliares (AA) e módulos de ligação a carboidratos (CBMs), foram anotados através do meta servidor gratuito dbCAN2 (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/blast.php>)(YIN et al., 2012; ZHANG et al., 2018) que integra três ferramentas /bancos de dados de última geração: HMMER (pesquisa contra banco de dados *dbCAN* HMM - Hidden Markov Model), DIAMOND (busca contra o banco de dados de sequência CAZyme pré-anotada de CAZy) e Hotpep (busca contra o banco de dados de peptídeos curtos CAZyme conservados).

2.9.3 RNAs funcionais

A busca por famílias de RNAs funcionais (RNA não codificantes, elementos cis-regulatórios estruturados e *self-splicing* RNAs) foi realizada no *Blast2GO/OmicsBox* executando o *Rfam* (KALVARI et al., 2017; KALVARI et al., 2018; NAWROCKI et al., 2014).

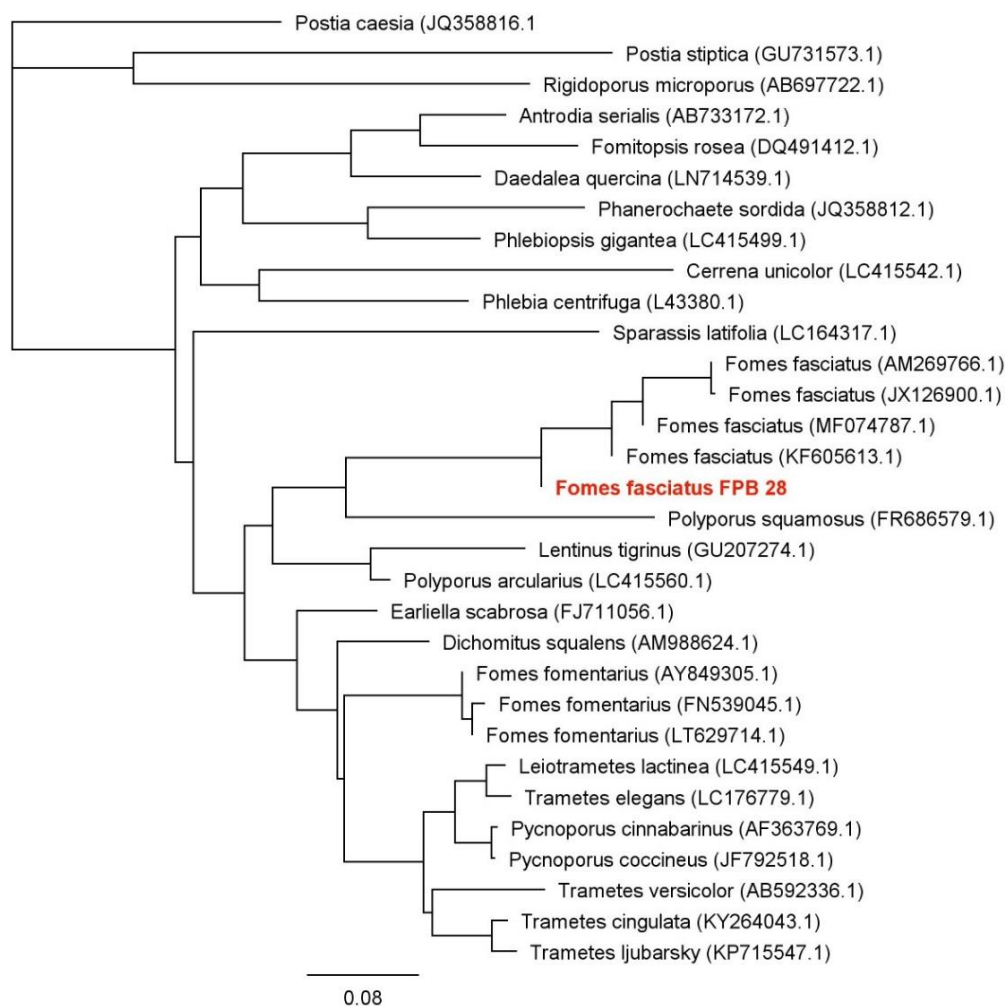
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Filogenia de *Fomes fasciatus*

O basidiomiceto *Fomes fasciatus* é um fungo de podridão branca, pertencente à família *Poliporaceae* (ordem *Poliporales*), a qual engloba diversos outros gêneros. É considerado um fungo com potencial para aplicação biotecnológica devido a sua capacidade em desconstruir a madeira (ELISASHVILI et al., 2009).

A análise filogenética utilizando a sequência ITS de *F. fasciatus* isolado do cerrado brasileiro e de outros basidiomicetos disponíveis no GenBank, possibilitou a construção da árvore mostrada na Figura 96.

Figura 69 - Árvore filogenética baseada na região ITS do rDNA mostrando a posição filogenética de *F. fasciatus* FPB-28.



Legenda: As sequências foram submetidas à análise filogenética utilizando Geneious R11 para construir uma árvore de união de vizinhos mais próximos. Os números de acesso do *GenBank* para cada cepa estão listados entre parênteses. A barra de escala representa a substituição de 0,07 nucleotídeos por posição de nucleotídeo.

Fonte: Do autor (2019).

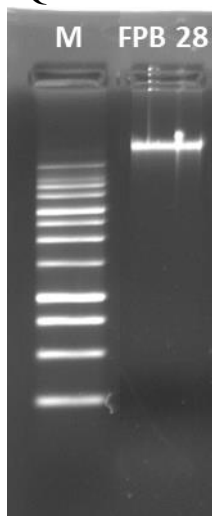
Outras análises envolvendo a região ITS de *Fomes fasciatus* e *Fomes fomentarius*, tem sugerido que ambos representam linhagens evolutivas distintas. Além disso, estas duas espécies apresentam comportamento fisiológico distinto em relação a temperatura (MCCORMICK et al., 2013).

Na análise realizada no presente trabalho isso foi evidenciado, mostrando que a linhagem *F. fasciatus* FPB-28 se distanciou de *F. fomentarius*. Além disso, percebe-se que a exemplo do encontrado no estudo de (JUDOVA et al., 2012) para *F. fomentarius*, também não houve uma homogeneidade genética entre a linhagem FPB 28 e outras espécies de *F. fasciatus*, sugerindo que há diversidade genética entre as linhagens, colocando-as em posições distintas.

3.2 Qualidade do DNA genômico

Foram obtidos $221 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA genômico de boa qualidade e integridade conforme mostrado na Figura 97.

Figura 70 – Qualidade do DNA obtido.



Legenda: Gel de agarose 1% com $1 \mu\text{L}$ de DNA genômico de *Fomes fasciatus* FPB-28. M: Marcador *GeneRuler*TM 1 kb Plus *Thermo Fisher Scientific*TM.

Fonte: Do autor (2019).

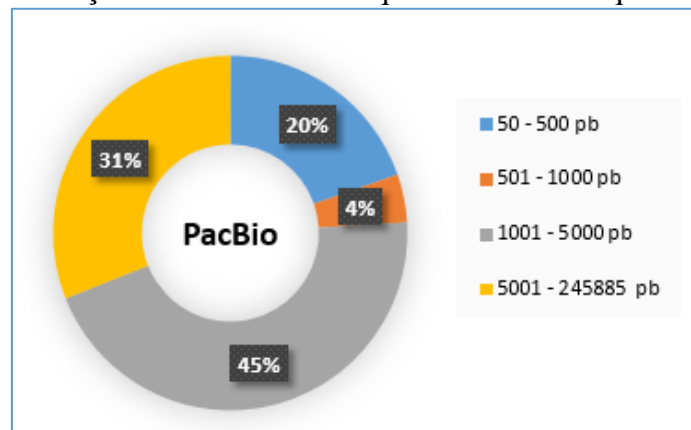
3.3 Qualidade das sequências após o sequenciamento *Illumina HiSeq 2500*

Foram obtidas um total de 20.818.739 sequências com comprimento de 150 pb e % GC = 48. Após trimagem obtivemos um total de 20.799.779 sequências com comprimento 20-150 pb e conteúdo de GC = 48 %. As sequências obtidas, no geral, apresentaram bons índices de qualidade viabilizando a etapa de montagem híbrida do genoma de *F. fasciatus*.

3.4 Sequências PacBio

Com o sequenciamento PacBio, obteve-se um total de 665.224 sequências de *F. fasciatus* com comprimento médio de 2754,963027 pb que variaram de 50 a 245.885 pb conforme mostrado na Figura 71.

Figura 71 – Distribuição do tamanho das sequências com o sequenciamento *PacBio*.



Fonte: Do autor (2019).

3.5 Montagem híbrida

Os resultados obtidos com a montagem híbrida do genoma de *F. fasciatus* utilizando o SPAdes estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 7 – Características Genômicas do basidiomiceto *F. fasciatus*.

Características Gerais	
Tamanho total do genoma (pb)	49.081.744
Número de <i>Scaffolds</i>	1.577
Tamanho maior <i>Scaffold</i> (pb)	166.185
Tamanho do menor <i>Scaffold</i> (pb)	2.494
N50 (pb)	38875
Conteúdo de GC (%)	53.87
Nº de sequências codificadoras	13.737

N50: Tamanho mínimo dos *Scaffolds* que cobrem 50% do total de bases montadas
Fonte: Do autor (2019).

Até o momento, não existem relatos do sequenciamento do genoma desta espécie pertencente a ordem *Poliporales* (filo Basidiomicetos e classe Agaricomycetos). Apesar

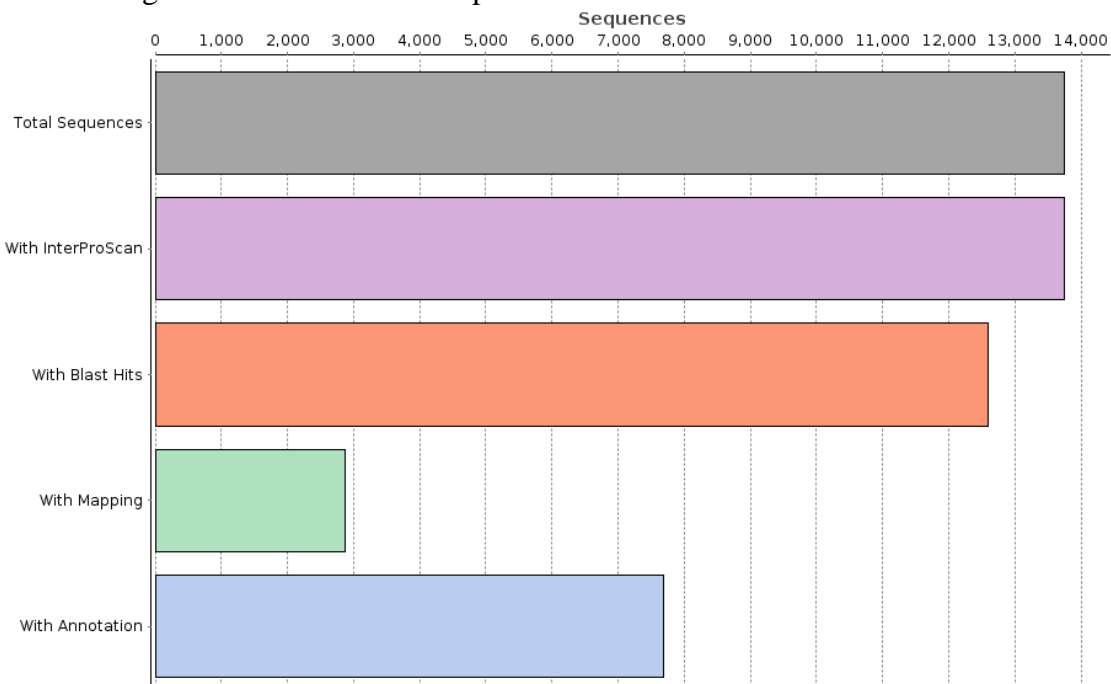
disto, consta no banco de dados do *Mycocosm* (<https://genome.jgi.doe.gov/>), o sequenciamento e montagem do genoma de espécie de mesmo gênero *Fomes fomentarius* CIRM-BRFM 1821 realizado em 2017. Todas as informações estão disponibilizadas para acesso no portal.

O genoma de *F. fomentarius* apresentou um tamanho de 40,95 Mb e 14.756 regiões codificadoras de proteínas, em comparação com *F. fasciatus*, este apresentou tamanho superior (49,08 Mb) e embora nossos dados indiquem um número inferior de regiões codificadoras (13.737) em comparação com *F. fomentarius*, isso pode variar em função da espécie (conforme mostrado no capítulo 4), e também o tipo de preditor utilizado (GUO et al., 2016). Além disso, através da análise filogenética foi possível observar que ambas as espécies apresentam um distanciamento na árvore filogenética apesar de serem do mesmo gênero.

3.6 Anotação estrutural do genoma de *Fomes fasciatus*

Como mencionado, foram previstos um total de 13.737 genes codificadores de proteínas CDS. As informações referentes às ações do projeto utilizando as ferramentas do software *Blast2GO/OmicsBox* podem ser visualizados na Figura 72.

Figura 72 – Resumo das etapas executadas no *Blast2GO/OmicsBox* .

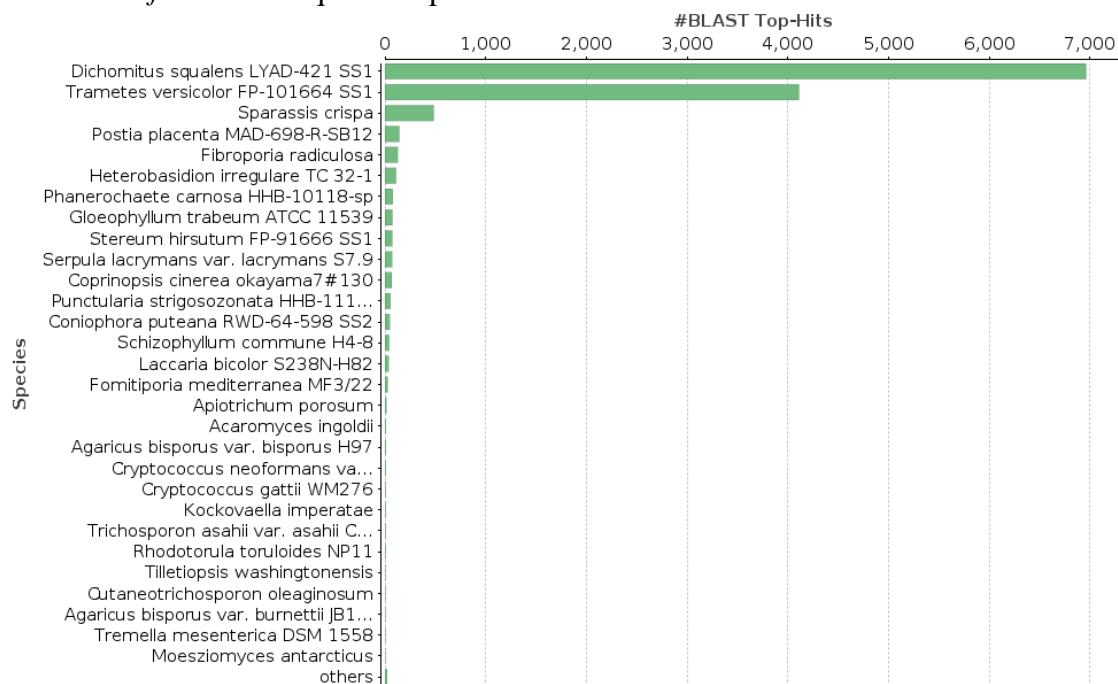


Legenda: Etapas executadas no *Blast2GO/OmicsBox* envolvendo as sequências codificadoras obtidas pelo *Genefinding*.

Fonte: Do autor (2019).

Do conjunto de seqüências que apresentaram *hits* no Blast, 6.962 apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-3}$) com seqüências de proteína de *Dichomitus squalens* LYAD-421 SS1, 4.111 com seqüências de proteínas de *Trametes versicolor* FP-101664 SS1, 484 com *Sparassis crispa* e 1.057 com outros fungos (FIGURA 73).

Figura 73 – Resultado da busca por similaridade entre as seqüências de proteínas de *F. fasciatus* e aquelas depositadas no NCBI.



Legenda: Seqüências de proteínas do genoma de *F. fasciatus* contra seqüências de proteínas não redundantes da base de dados NCBI por meio do algoritmo BLASTp. No eixo y são mostradas as espécies com maior freqüência na busca por similaridade. No eixo x são mostrados os números de proteínas encontradas para cada espécie.

Fonte: Do autor (2019).

Conforme discutido no genoma de *F. flavus* (Capítulo 4), as similaridades de boa parte das seqüências de *F. fasciatus* com as seqüências de *D. squalens*, *T. versicolor* e *S. crispa* são justificadas pelos inúmeros trabalhos envolvendo estas espécies, levando ao sequenciamento e depósito de seqüências nas principais bases de dados. Além disso, como estas também são espécies da ordem *Polyporales* assim como *F. flavus* e *F. fasciatus*, é justificável o fato de haver similaridade entre as seqüências destes fungos.

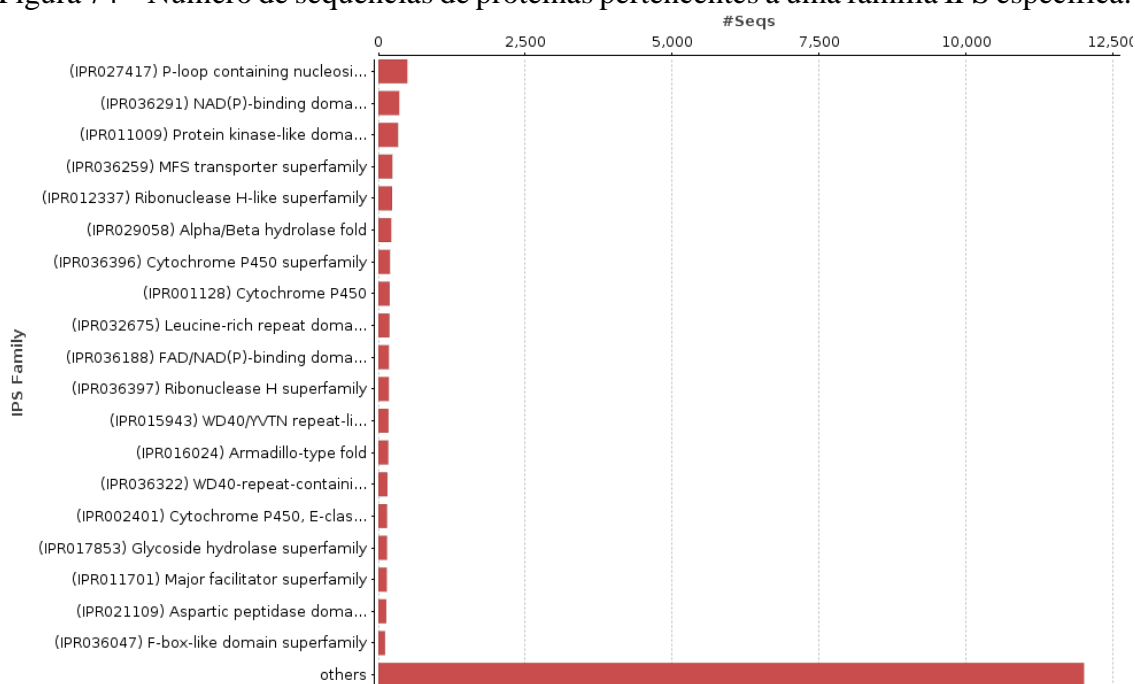
A presença de enzimas ligninolíticas extracelulares provenientes de *D. squalens* já foi reportada, principalmente, as enzimas manganês peroxidase e lacase (PÉRIÉ; MICHAEL, 1991). Também já foi investigada a capacidade desta espécie em descolorir corantes sintéticos em placas de ágar (EICHLEROVÁ; HOMOLKA; NERUD, 2006). O

mesmo ocorreu com *T. versicolor* e *S. crista* levando ao depósito de várias sequências destas espécies nos bancos de dados.

3.7 Classificação funcional das proteínas preditas

Observou-se que 491 sequências proteicas de *F. fasciatus* pertencem à superfamília homóloga “Loop-P contendo nucleosídeo trifosfato hidrolase (IPR 027417)”, 353 pertencem a “superfamília de domínios de ligação NAD (P) (IPR 036291)” e 334 sequências pertencem a “superfamília do domínio semelhante a proteína quinase (IPR011009)”. Foram atribuídas famílias específicas para um certo número de sequências proteicas, contudo, com representações inferiores a estas (somadas em “outros”) (FIGURA74).

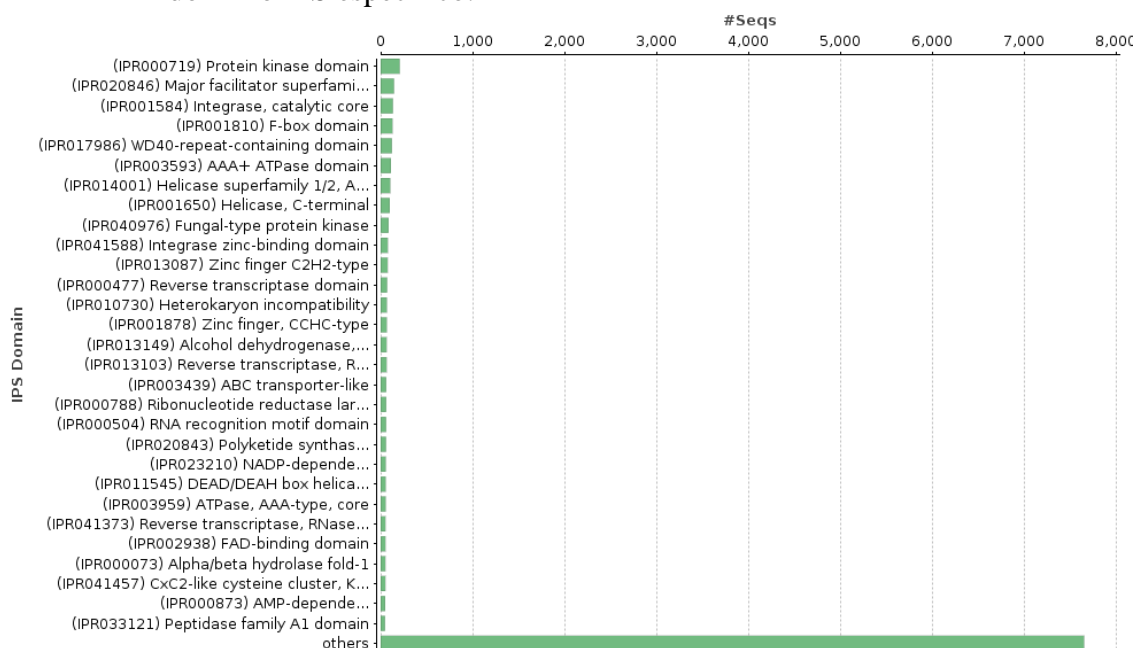
Figura 74 – Número de sequências de proteínas pertencentes a uma família IPS específica.



Fonte: Do autor (2019).

Em relação aos domínios IPS, um número maior de proteínas pertencem aos domínios “proteínas quinase (IPR000719)” e “facilitadores principais (IPR020846)” com 207 e 145 sequências, respectivamente. A soma do número de proteínas com representações inferiores e em outros domínios é mostrada em “outros” (FIGURA 75).

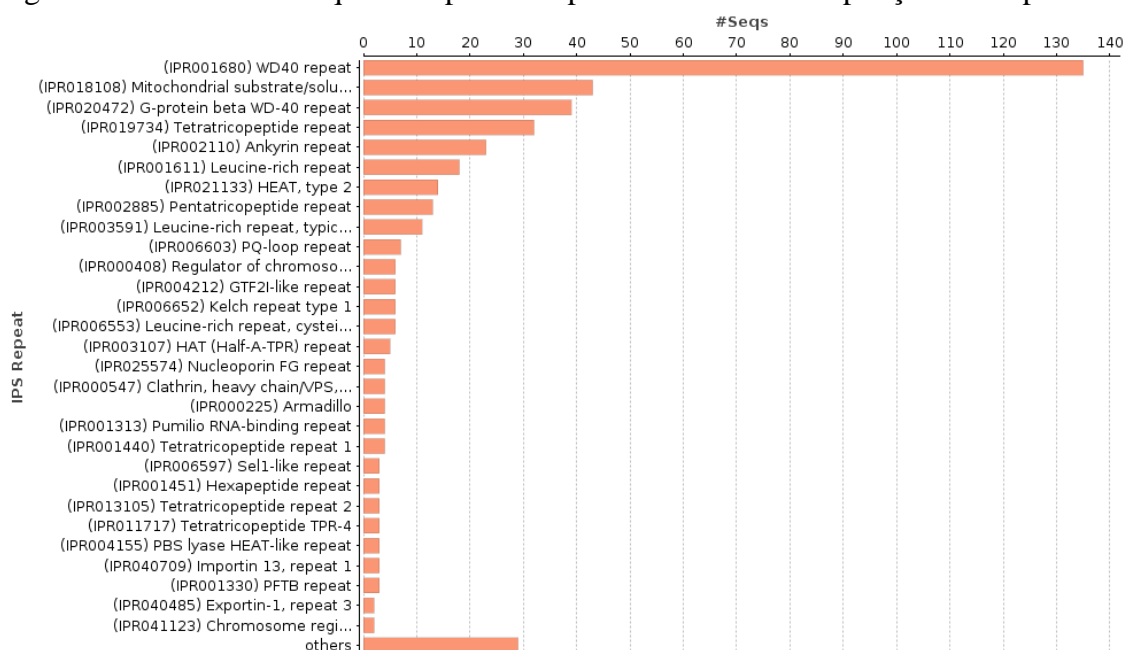
Figura 75 – Representação do número de seqüências proteicas que pertencem a um domínio IPS específico.



Fonte: Do autor (2019).

A análise de distribuição das repetições IPS mostrou que o número de seqüências de proteínas que apresentam o motivo “WD40 (IPR001680)” é predominante (135 proteínas representadas). Em seguida, as seqüências com os motivos “Substrato mitocondrial/portador de soluto (IPR018108)” com 43 seqüências e “Proteína G beta repetição WD-40” (IPR020472) com 39 seqüências representadas (FIGURA 76).

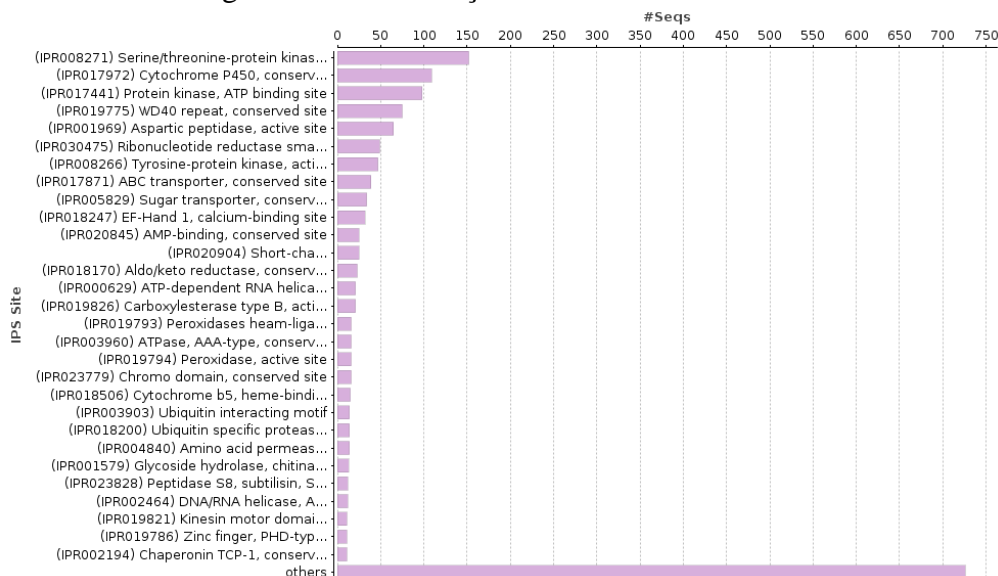
Figura 76 – Número de seqüências proteicas pertencentes a uma repetição IPS específica.



Fonte: Do autor (2019).

Em relação aos sítios IPS, 152 sequências estão representadas no sítio ativo “Serina/treonina proteína quinase (IPR008271)”, outras 109 sequências relacionadas com o sítio conservado “Citocromo P450 (IPR017972)” e 98 sequências relacionadas ao sítio ativado por ATP “Proteína quinase (IPR017441) (FIGURA 77).

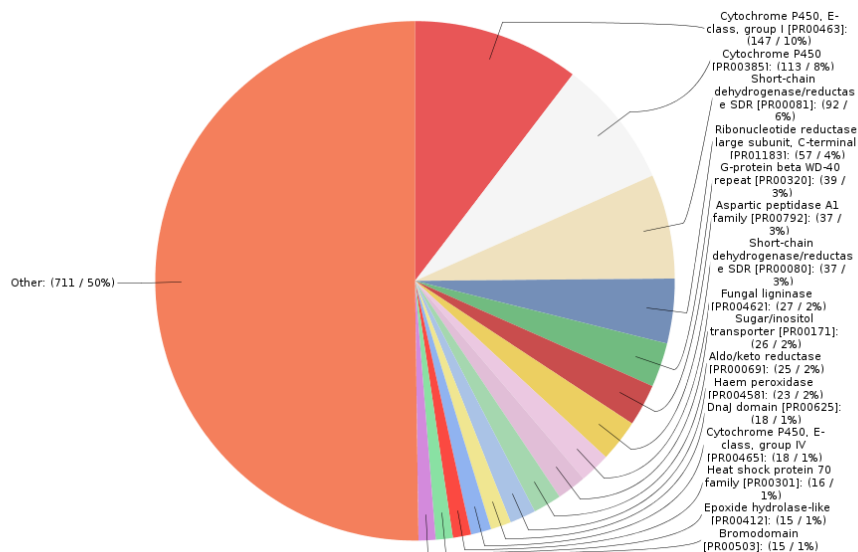
Figura 77 – Distribuição de sítios *InterProScan*.



Fonte: Do autor

Os domínios encontrados com a consulta na base *FPrintScan* são mostrados na Figura 78. Os domínios com maiores representações de proteínas foram “Citocromo P450, classe E, grupo I (PR00463)” e “Citocromo P450 (PF00385)” com 147 e 113 proteínas, respectivamente.

Figura 78 – Domínios *InterProScan* recuperados na base de dados *FPrintScan*.

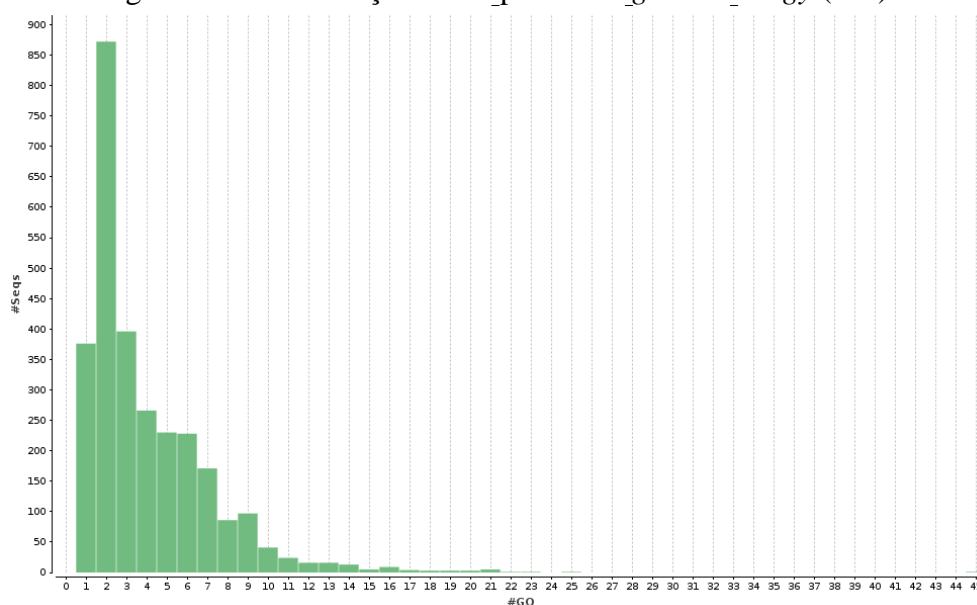


Fonte: Do autor (2019).

3.8 Mapeamento de ontologia genética

O mapeamento procedeu-se com parâmetros padrão do software *Blast2GO/OmicsBox* recuperando os termos do *Gene Ontology* (GO) associados a cada sequência (FIGURA 79). A Base *InterPro* apresentou maior número de termos associados as sequências de *F. fasciatus* (6.507) seguido das bases *UniProt* (4.154) e *EnsemblFungi* (813) (FIGURA 80).

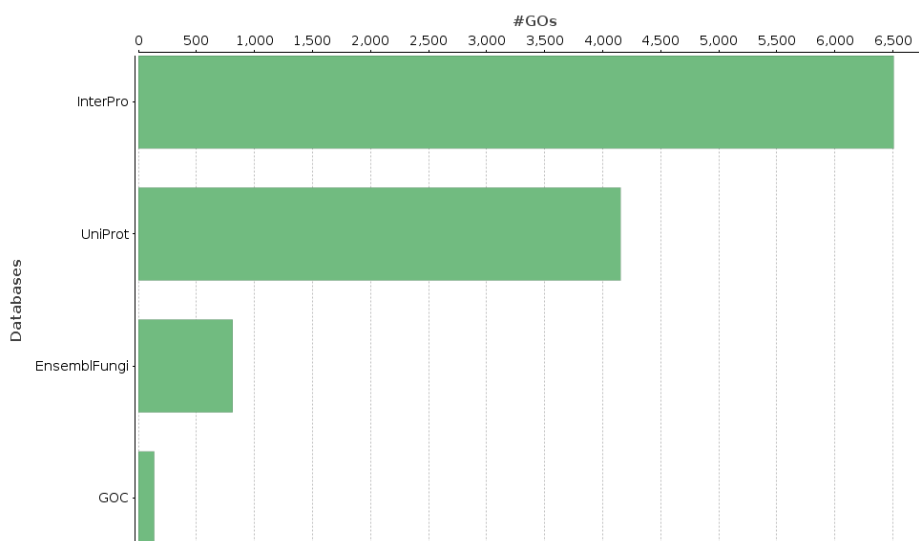
Figura 79 – Distribuição do mapeamento *gene ontology* (GO).



Legenda: Evidencia da distribuição da quantidade de termos candidatos do *Gene Ontology* atribuídos a cada sequência durante a etapa de mapeamento.

Fonte: Do autor (2019).

Figura 80 - Distribuição do número de anotações (Termos GO) recuperadas dos diferentes bancos de dados.

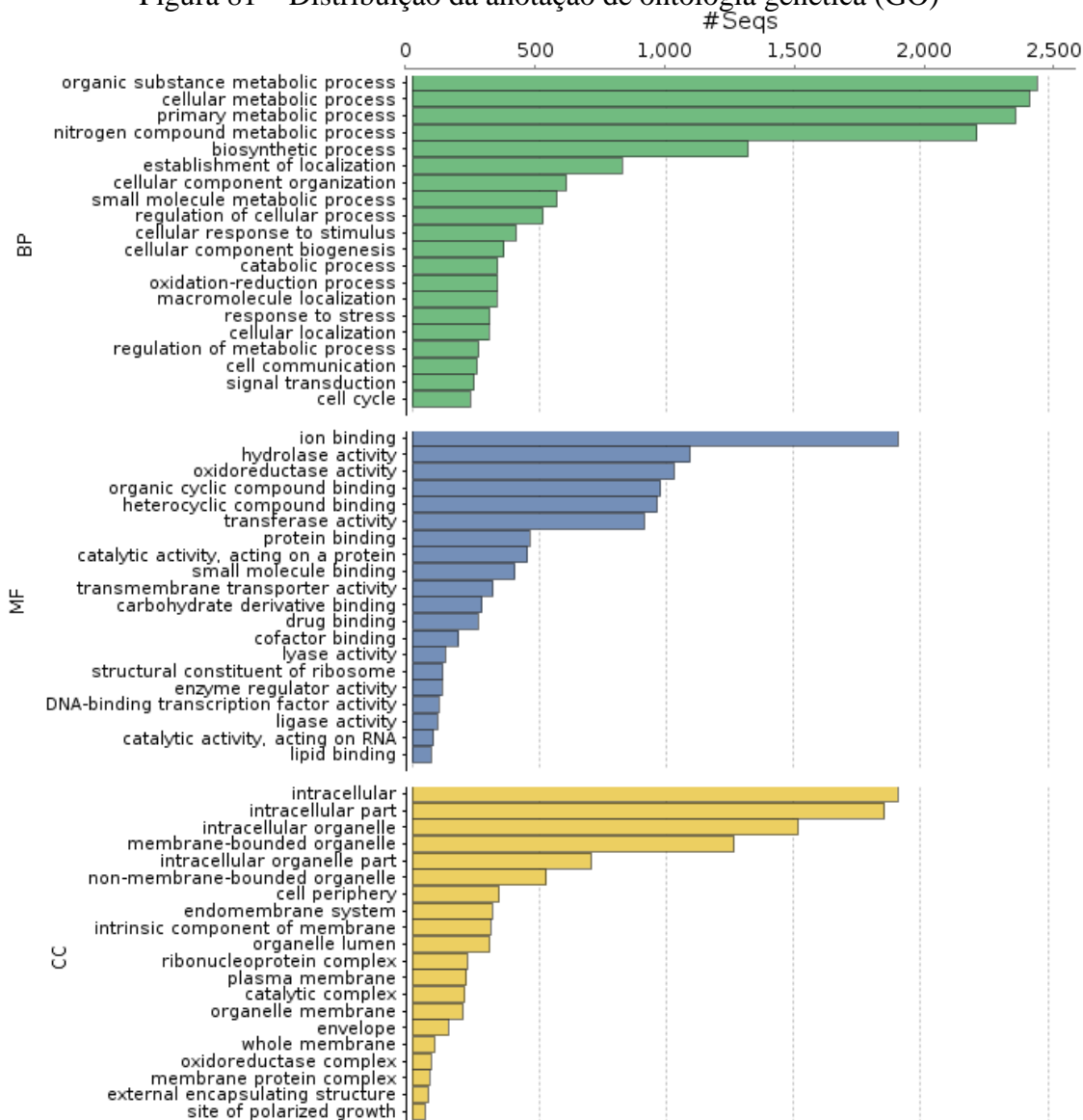


Fonte: Do autor (2019).

3.9 Anotação de ontologia genética

No total, foram obtidas 37.076 anotações distribuídas em três categorias (componente celular, função molecular e processo biológico) no nível hierárquico 03 do GO (FIGURA 81). Algumas proteínas foram anotadas em mais de uma categoria, contudo, processo biológico foi a categoria mais representada com 16.698 anotações, seguida de componente celular com 10.391 anotações e por último, função molecular com 9.987 anotações.

Figura 81 – Distribuição da anotação de ontologia genética (GO)

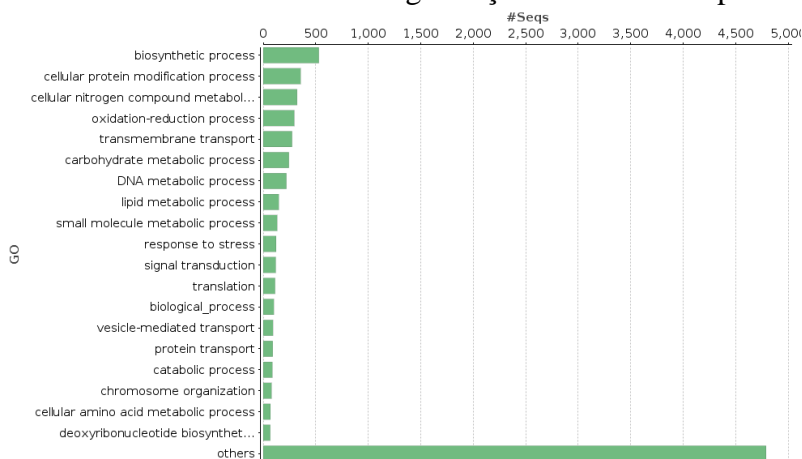


Legenda: Distribuição de nível 03 de termos GO incluindo processos biológicos (BP) (Barras em verde), função molecular (MF) (Barras em azul) e componente celular (CC) (Barras em amarelo) entre todas as proteínas anotadas (são mostrados apenas os 20 resultados mais representativos de cada categoria).

Fonte: Do autor (2019).

Considerando a categoria processo biológico no nível hierárquico 03, os termos “processo biossintético”, “processo de modificação de proteínas celulares” e “processo metabólicos de compostos nitrogenados celulares” foram os mais representados, com 530, 356 e 323 proteínas, respectivamente. (FIGURA 82).

Figura 82 – Resultado da análise de categorização funcional das proteínas (BP).

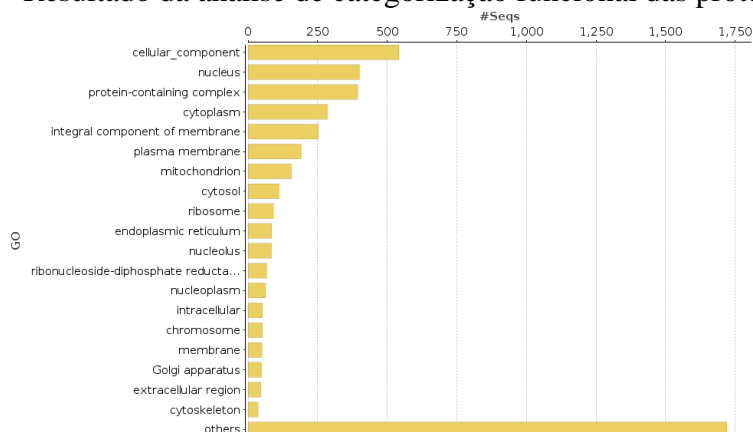


Legenda: Categorização funcional das proteínas encontradas no genoma de *F. fasciatus* – FPB28 que apresentaram similaridade significativa. No eixo y estão os termos do GO descritos para a categoria processo biológico (BP), no nível hierárquico 03. No eixo x estão os números de proteínas encontradas para cada termo do GO nesta categoria.

Fonte: Do autor (2019).

Para a categoria componente celular, considerando o nível hierárquico 03, o termo mais representado foi “componente celular” com 542 proteínas, em seguida, os termos “núcleo” e “complexo contendo proteínas” com 400 e 394 proteínas, respectivamente (FIGURA 83).

Figura 83 – Resultado da análise de categorização funcional das proteínas (CC).

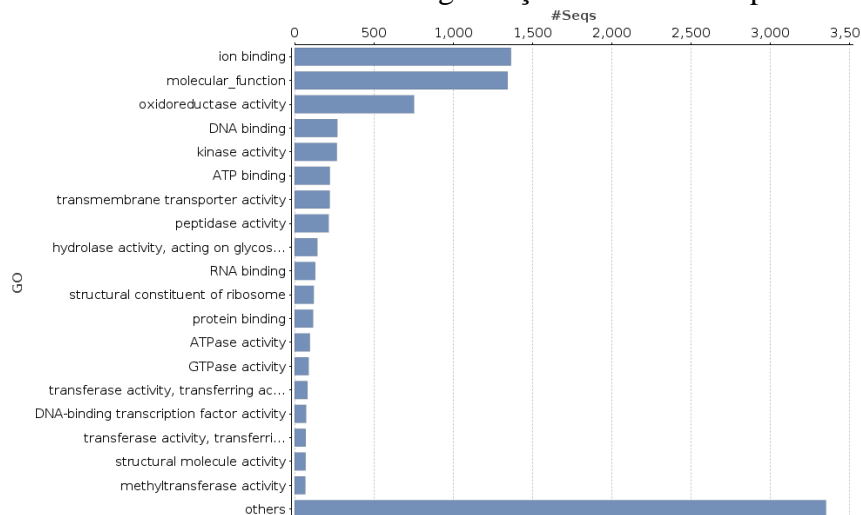


Legenda: categorização funcional das proteínas encontradas no genoma de *F. fasciatus* FPB-28 que apresentaram similaridade significativa. No eixo y estão os termos do GO descritos para a categoria componente celular (CC), no nível hierárquico 03. No eixo x estão os números de proteínas encontradas para cada termo do GO nesta categoria.

Fonte: Do autor (2019).

Em relação a categoria função molecular (nível hierárquico 03), os termos mais representados pelas proteínas preditas de *F. fasciatus*, foram “ligação de íon” (1366), “função molecular” (1345), “atividade oxidorreductase” (754) e “ligação de DNA” (270) (FIGURA 84).

Figura 84 – Resultado da análise de categorização funcional das proteínas (MF)



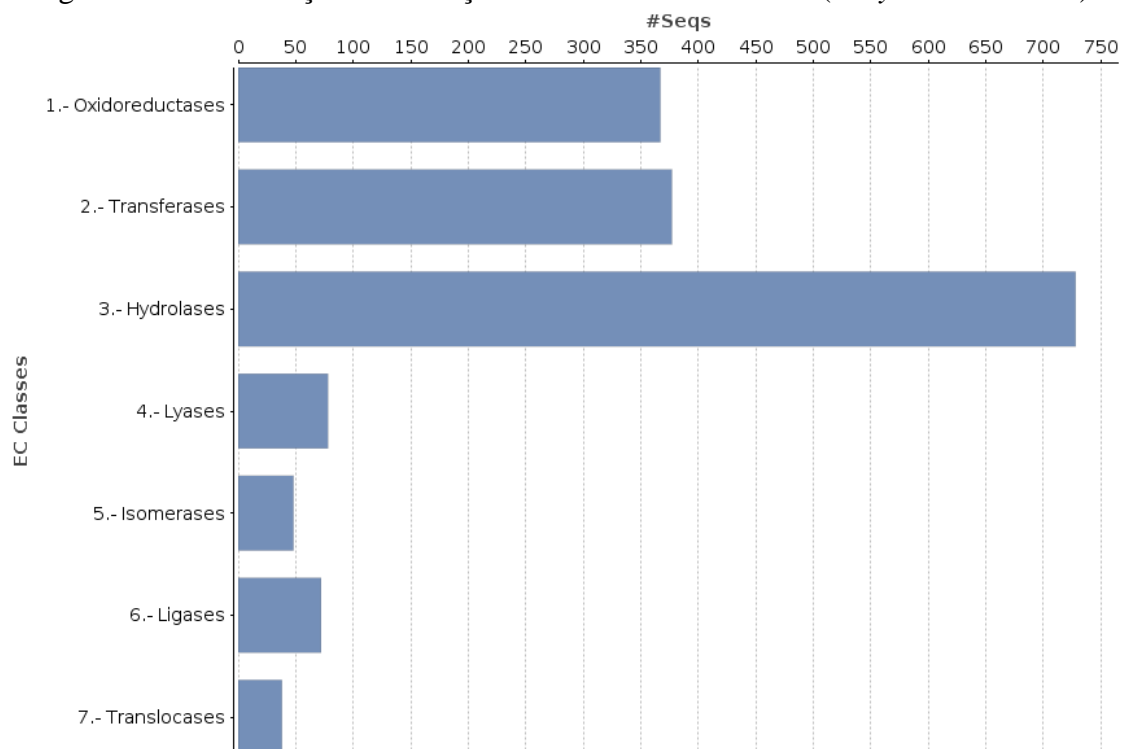
Legenda: Categorização funcional das proteínas encontradas no genoma de *F. fasciatus* – FPB28 que apresentaram similaridade significativa. No eixo y estão os termos do GO descritos para a categoria função molecular (MF), no nível hierárquico 03. No eixo x estão os números de proteínas encontradas para cada termo do GO nesta categoria.

Fonte: Do autor (2019).

3.10 Anotação das classes enzimáticas

Os resultados obtidos anteriormente condizem com os códigos enzimáticos “*Enzyme codes (EC)*” obtidos (1.708), em que as classes enzimáticas mais representadas foram as hidrolases (EC 3), transferases (EC 2) e as oxirredutases (EC 1), com 728, 377 e 367 proteínas, respectivamente (FIGURA 85).

Figura 85 – Distribuição da anotação das classes enzimáticas (*Enzyme codes - EC*).



Fonte: Do autor (2019).

Conforme discutido no capítulo anterior (genoma do *F. flavus*), em relação os principais grupos enzimáticos presentes nos genomas dos macro-basidiomicetos, os mesmos também foram encontrados no genoma de *F. fasciatus*, verificando-se um maior número de sequências preditas relacionadas com ação hidrolítica (Hidrolases EC 3), seguida de Transferases (EC 2) e Oxirredutases (EC 1).

Os secretomas destes fungos de podridão branca (macro-basidiomicetos), tem revelado uma grande quantidade de enzimas com atividade hidrolítica (VALAŠKOVA; BALDRIAN, 2006), e nos últimos 25 anos, muitas oxidoreductases, envolvidas no processo de quebra da lignina e de outros compostos recalcitrantes, tem sido intensamente caracterizada e estudada, como as peroxidases (MnP, LiP, VP) e oxidases (lacases) (HOEGGER et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2018; SCHEIBNER et al., 2008). Apesar disso, as LPMOs e peroxidases de corante – descolorante (DyPs) ainda são pouco exploradas (MARTINEZ et al., 2017).

Neste contexto, as monoxigenases do citocromo P450 foram associadas à ação dos macro-basidiomicetos na remoção de contaminantes (xenobióticos) (CAMERON; AUST, 1999). As P450 constituem uma parte essencial dos sistemas enzimáticos intracelulares, pois podem utilizar o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons

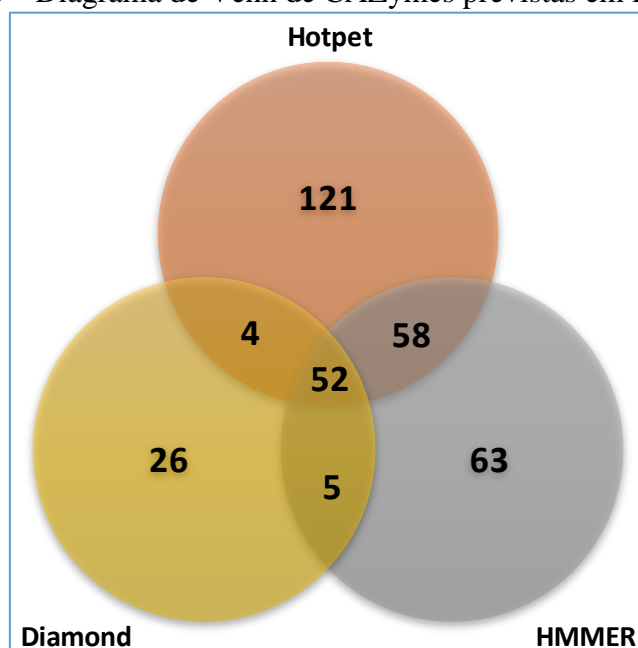
(HUANG et al., 2018). Além disso, foi verificado que estas enzimas, desempenham importante papel no reconhecimento do substrato e na oxidação região-seletiva (SUBRAMANIAN; YADAV, 2009).

Com base nas proteínas preditas e anotadas, o genoma de *F. fasciatus* revelou 253 domínios com base nas informações recuperadas da base *FPrintScan*.

3.11 CAZymes preditas do genoma de *F. fasciatus*

A partir da anotação das CAZymes do genoma de *F. fasciatus*, identificou-se genes envolvidos na quebra de carboidratos. Empregando-se o mesmo método do capítulo anterior (*F. flavus*), *Fomes fasciatus* FPB 28 também teve as sequências de aminoácidos previstas confrontadas com as bases de dados do meta servidor dbCAN2. A anotação identificou 330 CAZymes no total a partir das ferramentas de busca consultadas (FIGURA 86).

Figura 86 – Diagrama de Venn de CAZymes previstas em *F. fasciatus*

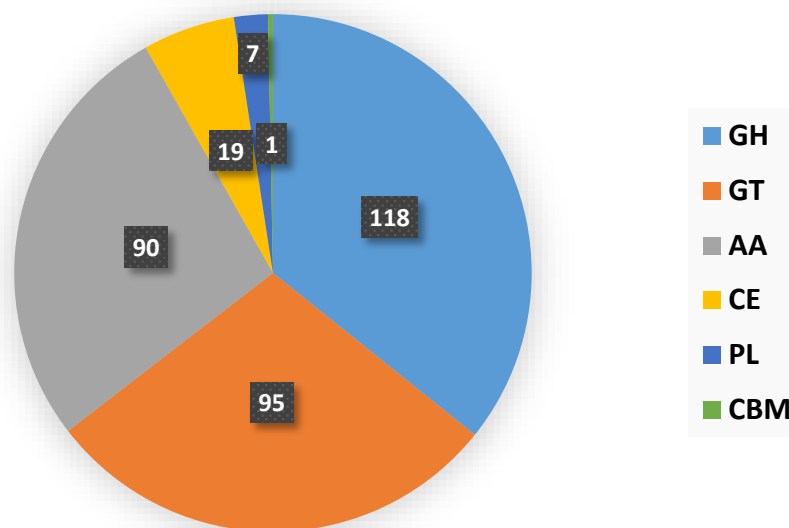


Legenda: CAZymes previstas em *F. fasciatus* a partir de três ferramentas / bases de dados HMMER, Diamond e Hotpep.

Fonte: Do autor (2019).

As CAZymes previstas no genoma de *F. fasciatus* foram classificadas de acordo com as famílias onde se observa uma predominância de genes de hidrolases de glicosídeos ou glicosil-hidrolases seguido de Glicosil-transferases e atividades auxiliares (FIGURA 87).

Figura 87 – Enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) do genoma de *F. fasciatus*.



Legenda: Atividades auxiliares (AA); Módulo de ligação a carboidratos (CBM); Esterase de carboidrato (CE); Hidrolase de glicosídeo ou Glicosil-hidrolases (GH); Glicosiltransferase (GT) e liase de polissacarídeo (PL).

Fonte: Do autor (2019).

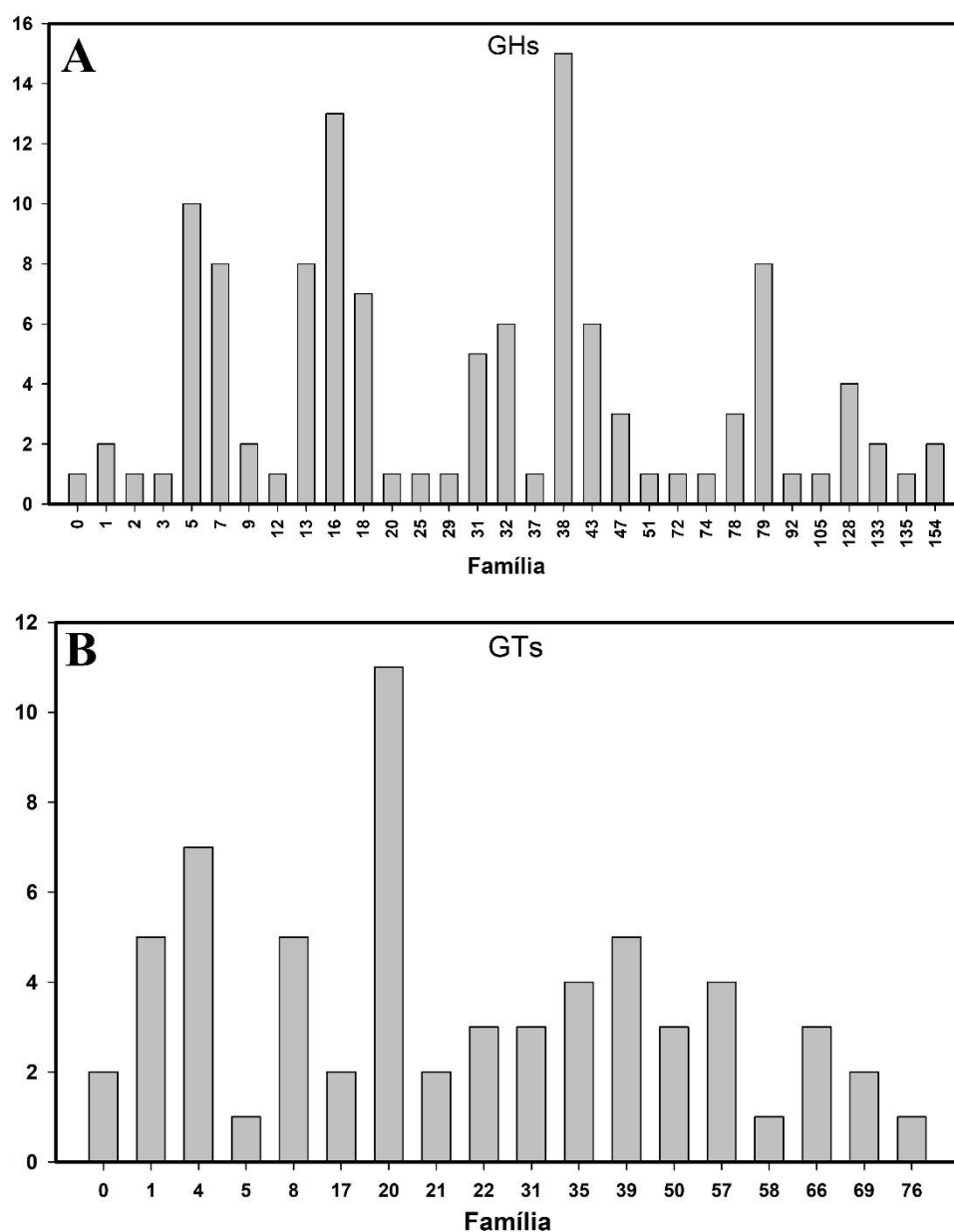
3.11.1 Glicosil-hidrolases (GHs)

Foram previstos muitos genes relacionados a celulases no genoma de *F. fasciatus*. Dentre as glicosil-hidrolases, a maior parte associado a família GH 38 α -manosidase (EC 3.2.1.24); α -1,2-manosidase de manosil-oligossacarídeo (EC 3.2.1.113); manosil-oligossacarídeo α -1,3-1,6-manosidase (EC 3.2.1.114); hidrolase de α -2-O-manosilglicerato (EC 3.2.1.170); α -1,3-manosidase de manosil-oligossacarídeo (EC 3.2.1.-), posteriormente, ação sobre ligações β -1,4 ou β -1,3 glicosídicas de glucanos e galactanos (GH16) e celulases (GH5). Também foram previstos genes de GHs da família 18 que correspondem a quitinases cataliticamente ativas (EC 3.2.1.14), endo- β -N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.96) e subfamílias de proteínas não-hidrolíticas que atuam como módulos de ligação a carboidratos / "lectinas" ou como inibidores da xilanase. Outro grupo de destaque foram aqueles que codificam enzimas que agem sobre substratos com ligações α -glicosídicas (GH13) (FIGURA 88 A).

3.11.2 Glicosil-transferases (GTs)

Em relação as GTs, no genoma de *F. fasciatus* foram previstos genes que codificam 18 famílias conforme é mostrado na Figura 88 B. As GTs catalisam a síntese de glicosídeos utilizando vários derivados do açúcar-1-fosfato (CAMPBELL; DAVIES; BULONE, 1998).

Figura 88 – Número de CAZymes em *F. fasciatus*.



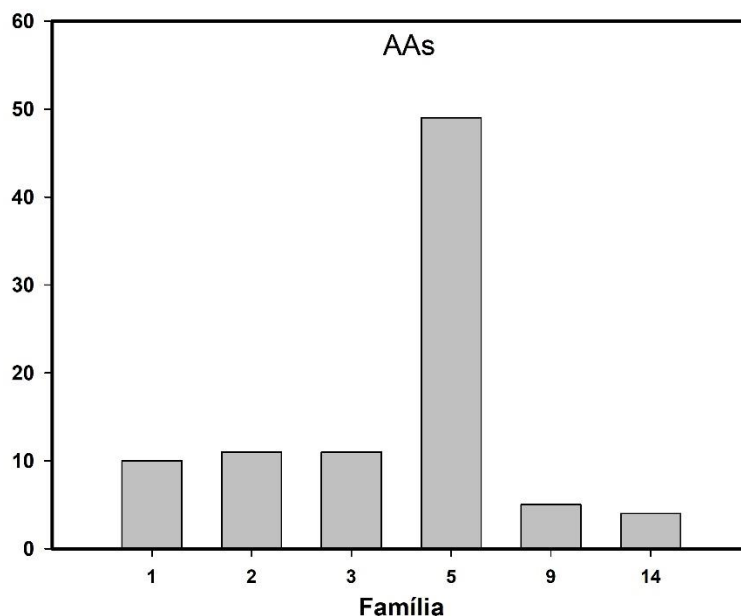
Legenda: Número de famílias (A) hidrolases de glicosídeos - GHs; (B) Glicosiltransferases – GTs.

Fonte: Do autor (2019).

3.11.3 Atividades Auxiliares (AAs)

Em relação aos genes de enzimas acessórias, os mais representados são os das famílias (AA5), (AA2), (AA3) e (AA1), respectivamente (FIGURA 89).

Figura 89 – Número de CAZymes família AA em *F. fasciatus*.



Fonte: (Do autor, 2019)

Como mencionado no capítulo anterior, a família AA5 corresponde às enzimas oxidativas que inclui as lacases. As AA2 são presentes principalmente nos macrobasidiomicetos (peroxidase de lignina, peroxidase de manganês e peroxidases versáteis). Enzimas da família AA3 são mais abundantes em fungos que degradam a madeira, exibindo alta multigenicidade (SÜTZL et al., 2018).

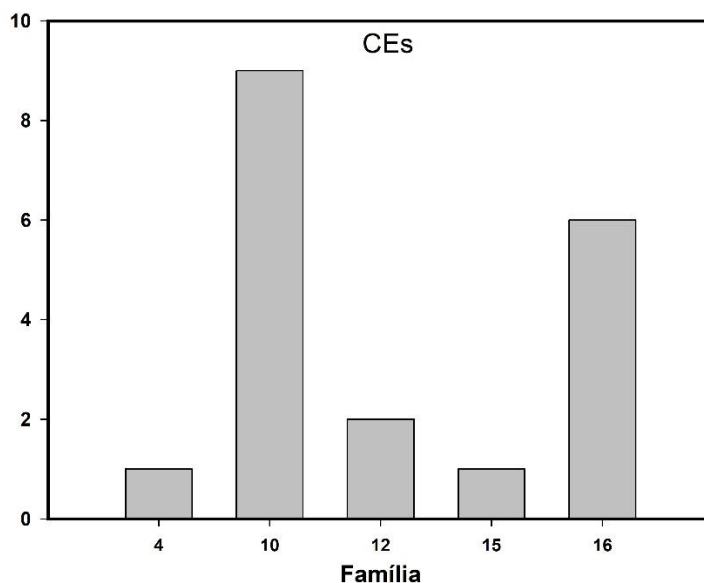
3.11.4 Módulos de ligação a carboidratos (CBMs)

Foi prevista 1 famílias de CBMs no genoma de *F. fasciatus* (CBM1) (módulos que se ligam a celulose) de acordo com as informações disponíveis na base CAZY (<http://www.cazy.org>).

3.11.5 Esterases de carboidratos (CEs)

As esterases das famílias CE10 e CE16 foram as mais representadas no genoma de *F. fasciatus*, respectivamente (FIGURA 90).

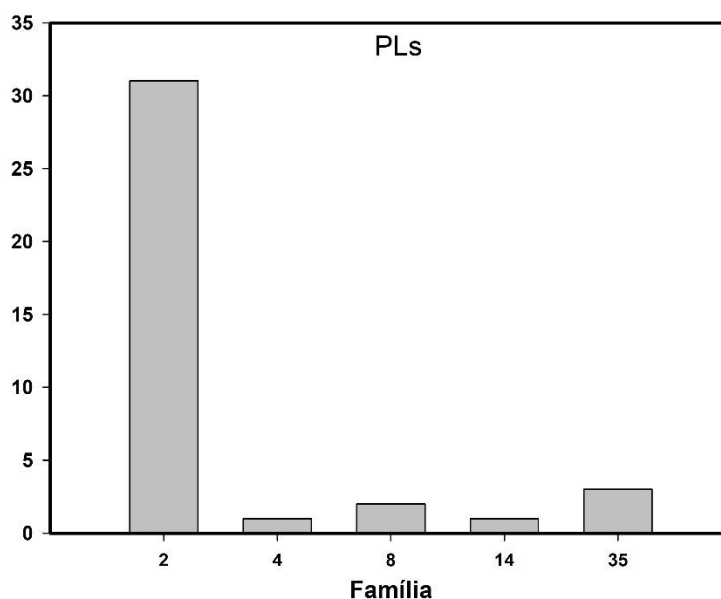
Figura 90 – Número de CAZymes família CE em *F. fasciatus*.



Fonte: (Do autor, 2019)

3.11.6 Liasas de polissacarídeos (PLs)

Finalmente em relação as PLs de *F. fasciatus*, um total de 5 famílias foram anotadas com destaque para PL2 (pectato-liase (EC 4.2.2.2); exo-poligalacturonato-liase (EC 4.2.2.9), também verificou-se genes da família PL4 que agem na quebra de ligações α -1,4-glicosídicas entre a L-ramnose e os ácidos D-galacturônicos, produzindo ácido α - Δ - (4,5) - d -galacturônico na extremidade não redutora (AZADI et al., 1995), PL8 e PL14 ambas encontradas também no genoma de *F. flavus* (capítulo 4) (FIGURA 91).

Figura 91 – Número de CAZymes PL em *F. fasciatus*.

Fonte: Do autor (2019).

Muitos estudos na área genômica tem mostrado que diferentes macro-basidiomicetos apresentam um conjunto distinto de *CAZymes* que permite que estes organismos de adaptem às condições ambientais de seu habitat (HORI et al., 2013; RILEY et al., 2014; RYTIOJA et al., 2017; SHAH et al., 2016). A habilidade de retirar energia de substratos complexos tem acompanhado estes fungos por milhões de anos através de famílias de genes conservadas, principalmente as Hidrolases de glicosídeo GHs (FLOUDAS et al., 2012).

O repertório de enzimas presente nos genomas de macro-basidiomicetos é variável de espécie para espécie, além disso, possuem capacidade de adaptação, podendo atuar na desconstrução de diferentes substratos lignocelulósicos, incluindo resíduos agroindustriais (PENG et al., 2018; RYTIOJA et al., 2017). Apesar disso, elucidações acerca da resposta molecular diante da mudança de substrato ainda estão no início o que tem estimulado pesquisas de comparação de genomas e transcritomas (PENG et al., 2018).

Nesse sentido, *F. fasciatus* linhagem FPB 28, foi selecionado para sequenciamento do genoma e transcrito (em andamento), por se tratar de um bom produtor de enzimas durante FES usando cacho vazio de dendê como substrato. Além disso, contribuiu para redução da lignina deste material. Seu extrato bruto também apresentou efeito positivo para remoção de alguns compostos fenólicos com enzimas de outros fungos em ensaio preliminar.

A anotação do genoma de *F. fasciatus*, revelou a presença de diversos genes que codificam importantes *CAZymes* envolvidas com a desconstrução da biomassa lignocelulósica, entre elas, diversas GHs, enzimas acessórias da família AA9 (LPMOs) e AA2 (LiP, MnP e VP). Este repertório é característico de fungos de podridão branca permitindo a completa mineralização da biomassa a CO₂ (FARACO, 2013). Adicionalmente, estas enzimas podem apresentar efeitos positivos em misturas com celulases os fungos ascomicetos *Aspergillus niger* ou *Trichoderma reesei* (SÁNCHEZ, 2009).

A degradação da lignina pode ser potencializada também pela ação de outras enzimas como lacases (EC 1.10.3.2; CAZy AA1), capazes de oxidar muitos compostos fenólicos e não fenólicos (CRAGG et al., 2015) e aquelas da família AA3: aril álcool oxidases (AAO; EC 1.1.3.7), glioxilato oxidase (GOx EC 1.2.3.5) piranose 2-oxidase (glicose 1-oxidase; EC 1.1.3.4) e celobiose desidrogenase (CDH, EC 1.1.99.18) (GUILLÉN; MARTÍNEZ; MARTÍNEZ, 1992; KERSTEN; CULLEN, 2007). Curiosamente, famílias destas enzimas também foram encontradas na anotação de *F. fasciatus*, corroborando com outros resultados e reforçando o potencial genético deste fungo, principalmente, frente aos desafios da degradação da lignocelulose.

4 CONCLUSÃO

O sequenciamento do genoma do fungo *Fomes fasciatus* linhagem FPB-28, empregando-se as plataformas de sequenciamento de nova geração *Pacific Biosciences (PacBio RS II)* e *Illumina (HiSeq 2500)*, permitiu uma montagem híbrida de boa qualidade. Até o momento não há relatos de genoma desta espécie, dessa forma, os dados obtidos servirão como referência para o sequenciamento de outros macro-basidiomicetos.

Nesse sentido, vai contribuir para estudos de desconstrução da biomassa, secreção de enzimas lignolíticas e auxiliares. A linhagem *F. fasciatus*, apresenta habilidade de produzir substâncias que contribuem para a redução de substâncias fenólicas. Também apresenta capacidade de agir sobre a lignina das fibras do cacho vazio de dendê durante FES. Assim, os objetivos específicos OE5 à OE10 foram alcançados com o sequenciamento e anotação da linhagem FPB-28.

5 CONCLUSÃO GERAL

O objetivo de realizar o sequenciamento, montagem e anotação dos genomas de dois macro-basidiomicetos com capacidade de desconstrução do cacho vazio de dendê e secreção de enzimas extracelulares lignolíticas, foi alcançado. As linhagens *Flavodon flavus* FPB-04 e *Fomes fasciatus* FPB-28 apresentaram tais características durante os ensaios de triagem e composição de coquetéis/misturas enzimáticas. Ambos apresentam potenciais genes que podem vir a ser utilizados como base de processos biotecnológicos.

Os objetivos específicos foram alcançados e demonstrados nos capítulos que compõem este documento. No capítulo 2, o crescimento de 30 fungos macro-basidiomicetos em placas, foi avaliado em cultivos enriquecidos com substratos lignocelulósicos da agroindústria do óleo de palma. O crescimento dos macro-basidiomicetos no cacho vazio de dendê em sistema FES possibilitou a extração de *pool* enzimático que teve seu perfil enzimático avaliado. Os EBEs demonstraram efeito positivo sobre a hidrólise do CVD-AH em combinação com enzimas comerciais ou com EBE dos fungos comerciais *T. reesei* e *A. aculeatus*. *F. flavus* e *F. fasciatus* reuniram as melhores características (crescimento + vigor + sinergismo). Dessa forma os objetivos OE1, OE2 e OE3 foram alcançados.

Outro objetivo (OE4) foi caracterizar o CVD após pré-tratamento biológico com as oito (08) linhagens após 15 dias de FES, assim, verificou-se maior seletividade SLC para *F. flavus* (2,96) seguido de FPB-26 (nd) (1,64) e *F. fasciatus* (1,01). O macro-basidiomiceto *F. flavus* contribuiu também para a melhoria da digestibilidade do CVD levando ao rendimento de 15% de glicose quando hidrolisado com *Celic CTec3* (15 FPU.g⁻¹). Também foi verificado que o EBE de *F. fasciatus* FPB-28 tem ação sobre compostos fenólicos inclusive em combinação com EBEs de outros fungos. Apesar disso, este último ainda carece de mais investigações.

O sequenciamento, montagem e anotação de dois macro-basidiomicetos permitiu alcançar os objetivos OE5 à OE10 gerando um banco de dados de de genomas de dois macro-basidiomicetos desconstrutores de biomassa lignocelulósica (*F. flavus* e *F. fasciatus*). Foram identificados genes que codificam *CAZymes*, ou seja, enzimas que apresentam ação sobre a desconstrução da lignocelulose.

REFERÊNCIAS

- AZADI, P. et al. The backbone of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan I is cleaved by an endo hydrolase and an endo lyase. **Glycobiology**, v. 5, n. 8, p. 783-789, 1995.
- CAMERON, M. D.; AUST, S. D. Degradation of chemicals by reactive radicals produced by cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of biochemistry and biophysicST**, v. 367, n. 1, p. 115-121, 1999.
- CAMPBELL, J.; DAVIES, G.; BULONE, V. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 329, n. Pt 3, p. 719, 1998.
- CASTOLDI, R. et al. Biological pretreatment of *Eucalyptus grandis* sawdust with white-rot fungi: study of degradation patterns and saccharification kinetiCST. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 240-246, 2014.
- CHEN, L. et al. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160336, 2016.
- CRAGG, S. M. et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 29, p. 108-119, 2015.
- DASHTBAN, M. et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 1, n. 1, p. 36, 2010.
- EICHLEROVÁ, Ivana; HOMOLKA, Ladislav; NERUD, František. Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 16, p. 2153-2159, 2006.
- ELISASHVILI, V. et al. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 331-339, 2009.
- ELISASHVILI, V. et al. Wood-rotting fungi lignocellulolytic enzyme overproduction for application in lignocellulose biorefinery and bioremediation. **New Biotechnology**, 2016. ELSEVIER SCIENCE BV PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS. p.S189-S190.
- FARACO, V. Lignocellulose conversion. **Enzym Microbial Tools Bioethanol Prod**, 2013.
- FLOUDAS, D. et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1715-1719, 2012.
- GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Substrate specificity and properties of the aryl- alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, n. 2, p. 603-611, 1992.

- GUO, R. et al. Gene Prediction Based On a Generalized Hidden Markov Model and Some Statistical Models of Related States: a Review. **The International Conference on Biological Sciences and Technology**, 2016. Atlantis Press.
- HERMOSILLA, E. et al. Sequential white-rot and brown-rot fungal pretreatment of wheat straw as a promising alternative for complementary mild treatments. **Waste management**, v. 79, p. 240-250, 2018.
- HOEGGER, P. J. et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **The FEBS journal**, v. 273, n. 10, p. 2308-2326, 2006.
- HORI, C. et al. Genomewide analysis of polysaccharides degrading enzymes in 11 white-and brown-rot Polyporales provides insight into mechanisms of wood decay. **Mycologia**, v. 105, n. 6, p. 1412-1427, 2013.
- HSU, T.-A. Pretreatment of biomass. In: (Ed.). **Handbook on bioethanol**: Routledge, 2018. p.179-212.
- HUANG, D. et al. White rot fungi and advanced combined biotechnology with nanomaterials: promising tools for endocrine-disrupting compounds biotransformation. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 671-689, 2018.
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.
- JUDOVA, J. et al. The occurrence and rapid discrimination of *Fomes fomentarius* genotypes by ITS-RFLP analysis. **Fungal biology**, v. 116, n. 1, p. 155-160, 2012.
- KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal GenetiCST and Biology**, v. 44, n. 2, p. 77-87, 2007.
- KUMAR, S. et al. **Fungal Biorefineries**. Springer, 2018. ISBN 3319903799.
- LÓPEZ-ABELAIRAS, M. et al. Optimisation of the biological pretreatment of wheat straw with white-rot fungi for ethanol production. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 9, p. 1251-1260, 2013.
- MARTÍNEZ, A. et al. Biological lignin degradation. **Lignin Valoriz. Emerg. Approaches**, v. 19, p. 199-207, 2018.
- MARTINEZ, A. T. et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 6, p. 815-831, 2017.
- MCCORMICK, M. A. et al. Phylogenetic and phenotypic characterization of *Fomes fasciatus* and *Fomes fomentarius* in the United States. **Mycologia**, v. 105, n. 6, p. 1524-1534, 2013.
- MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MCCORMICK, M. A. et al. Phylogenetic and phenotypic characterization of *Fomes fasciatus* and *Fomes fomentarius* in the United States. **Mycologia**, v. 105, n. 6, p. 1524-1534, 2013.

MUSSATTO, S. I. **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Elsevier, 2016. ISBN 0128025611.

OH, Y. H. et al. Recent advances in development of biomass pretreatment technologies used in biorefinery for the production of bio-based fuels, chemicals and polymers. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 10, p. 1945-1959, 2015.

OHM, R. A. et al. GenomiCST of wood-degrading fungi. **Fungal GenetiCST and Biology**, v. 72, p. 82-90, 2014.

PENG, M. et al. Comparative analysis of basidiomycete transcriptomes reveals a core set of expressed genes encoding plant biomass degrading enzymes. **Fungal genetiCST and biology**, v. 112, p. 40-46, 2018.

PÉRIÉ, FREDERIC H.; GOLD, MICHAEL H. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 8, p. 2240-2245, 1991.

RILEY, R. et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9923-9928, 2014.

RYTIOJA, J. et al. The molecular response of the white- rot fungus *Dichomitus squalens* to wood and non- woody biomass as examined by transcriptome and exoproteome analyses. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 3, p. 1237-1250, 2017.

SAHA, B. C. et al. Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 29-35, 2016.

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

SCHEIBNER, M. et al. Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade β -carotene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 6, p. 1241-1250, 2008.

SHAH, F. et al. Ectomycorrhizal fungi decompose soil organic matter using oxidative mechanisms adapted from saprotrophic ancestors. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1705-1719, 2016.

SHAH, T.; ULLAH, R. Pretreatment of wheat straw with ligninolytic fungi for increased biogas productivity. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-12, 2019.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-17, 2017.

SUBRAMANIAN, V.; YADAV, J. S. Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus

Phanerochaete chrysosporium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 17, p. 5570-5580, 2009.

SÜTZL, L. et al. Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2477-2492, 2018.

TAPIA- BLÁCIDO, D. R.; MANIGLIA, B. C.; MARTELLI- TOSI, M. Biopolymers from Sugarcane and Soybean Lignocellulosic Biomass. **Sustainable Polymers from Biomass**, p. 227-253, 2017.

VALAŠKOVA, V.; BALDRIAN, P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus Piptoporus betulinus—production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. **Microbiology**, v. 152, n. 12, p. 3613-3622, 2006.

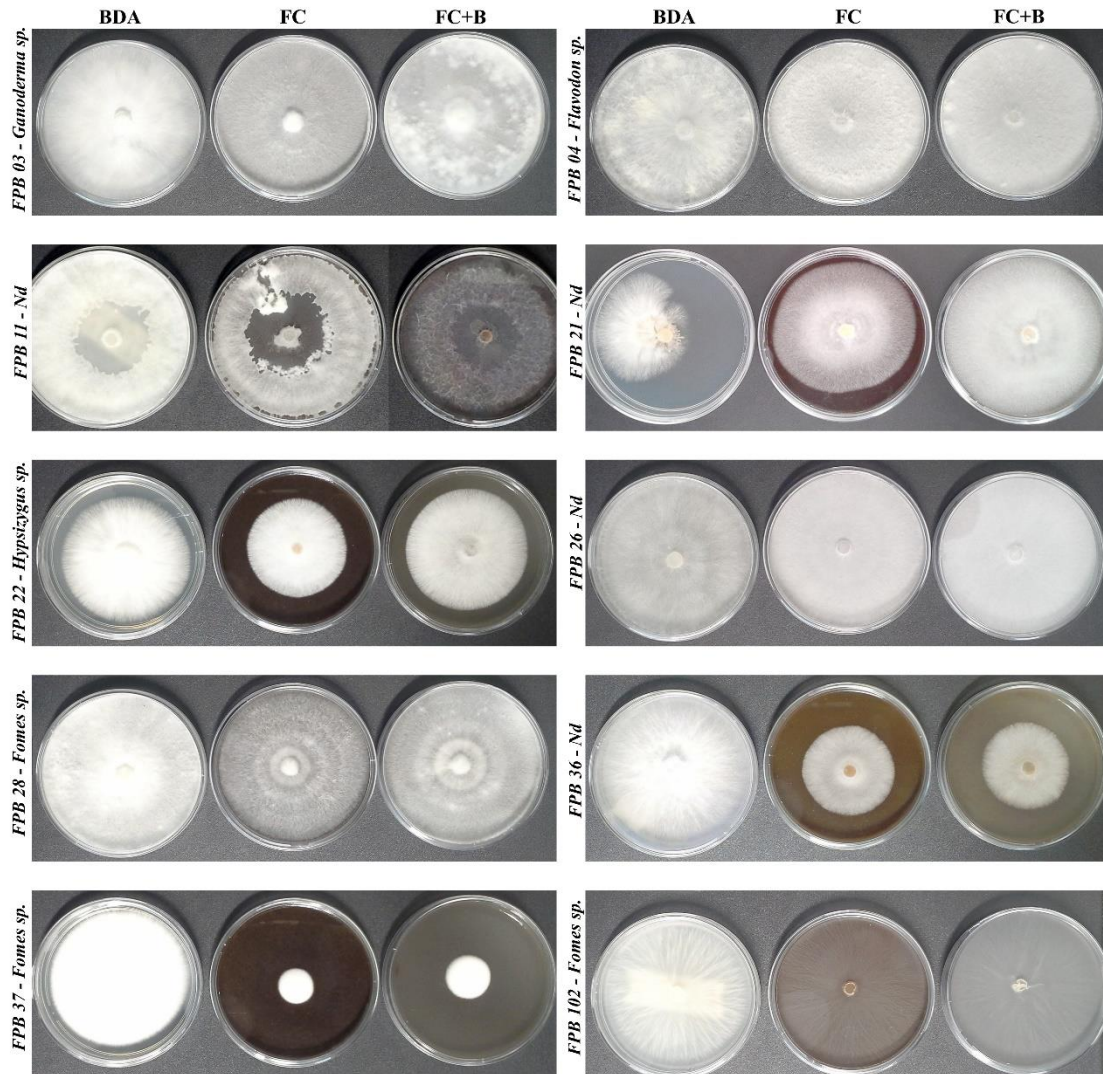
YAO, M. et al. Genome sequence of the white-rot fungus Irpex lacteus F17, a type strain of lignin degrader fungus. **Standards in genomic sciences**, v. 12, n. 1, p. 55, 2017.

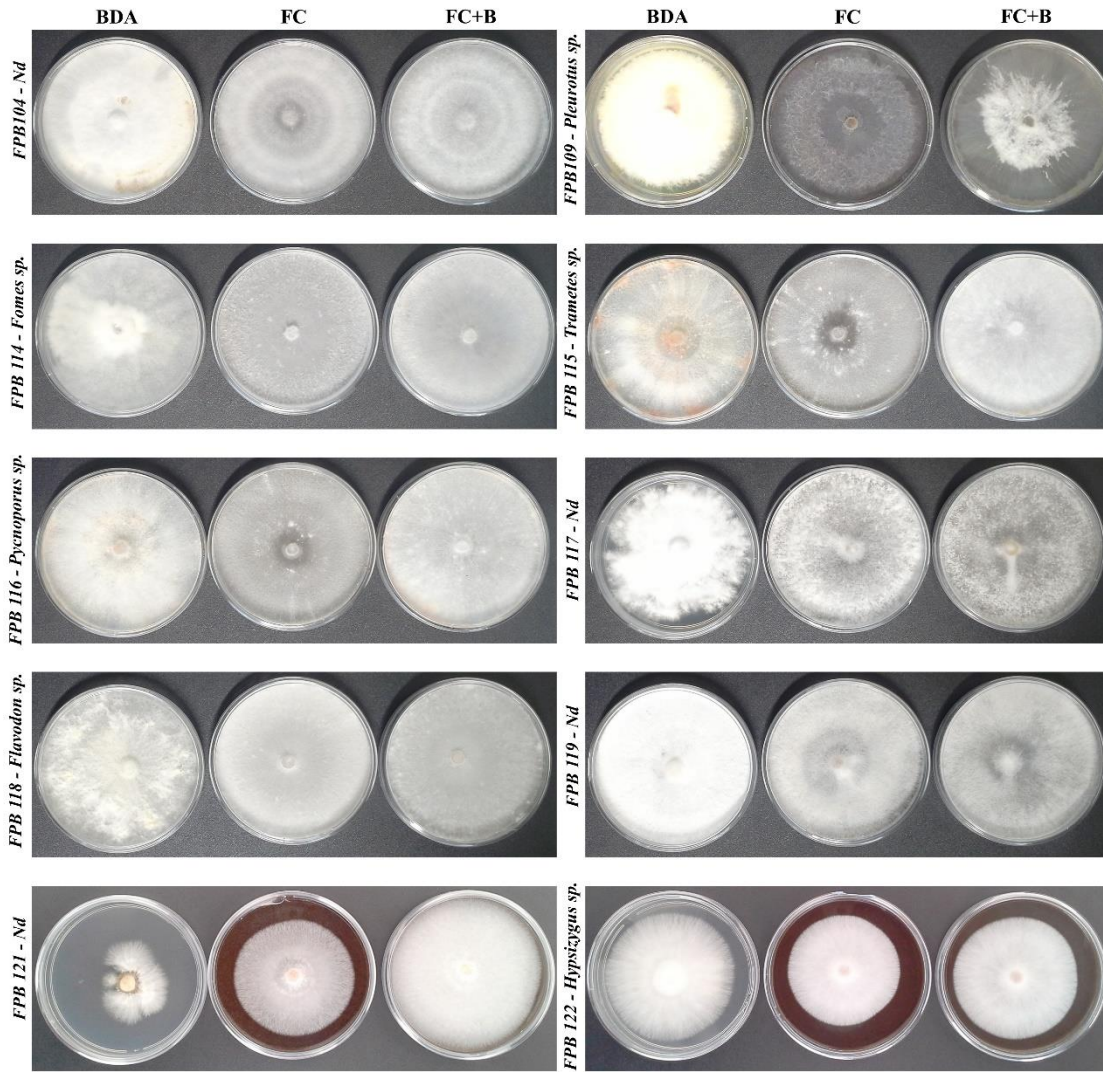
ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in energy and combustion science**, v. 42, p. 35-53, 2014.

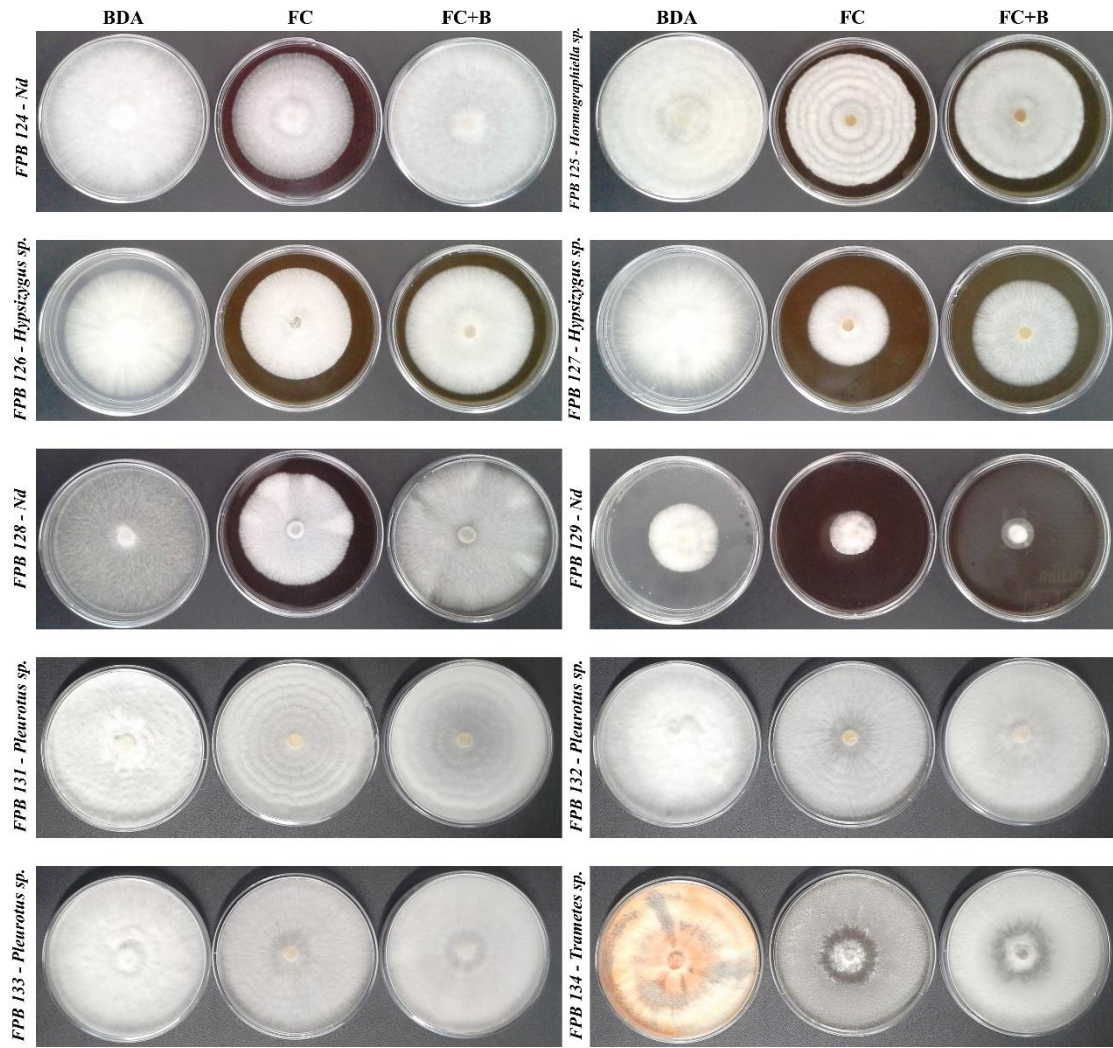
ZIMIN, A. V. et al. The MaSuRCA genome assembler. **Bioinformatics**, v. 29, n. 21, p. 2669-2677, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Registro fotográfico das colônias de macro-basidiomicetos aos 11 dias de cultivo em meios ágar-enriquecidos

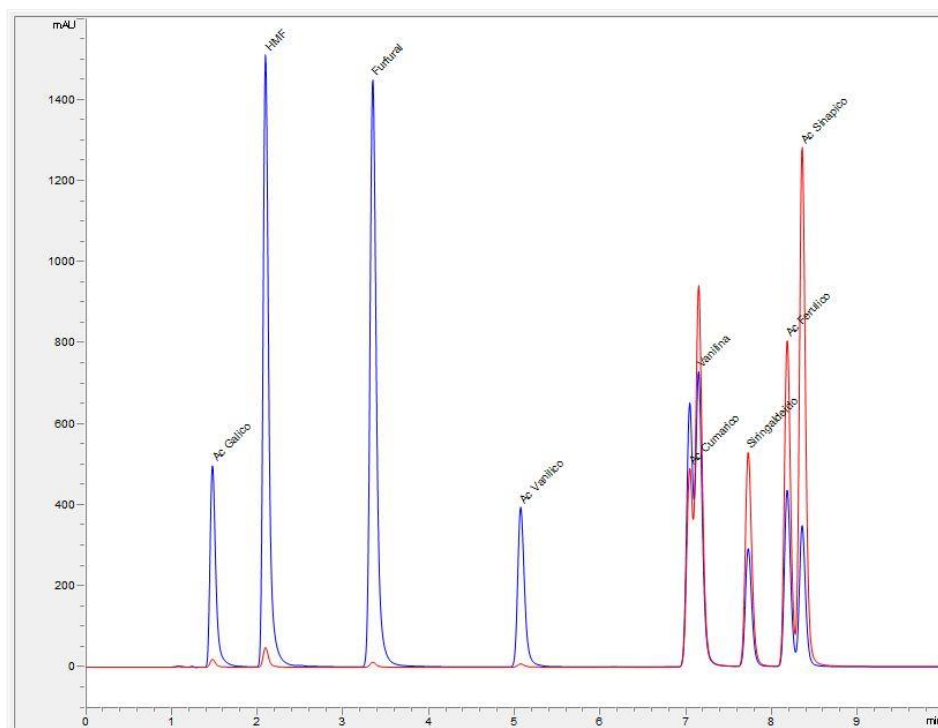




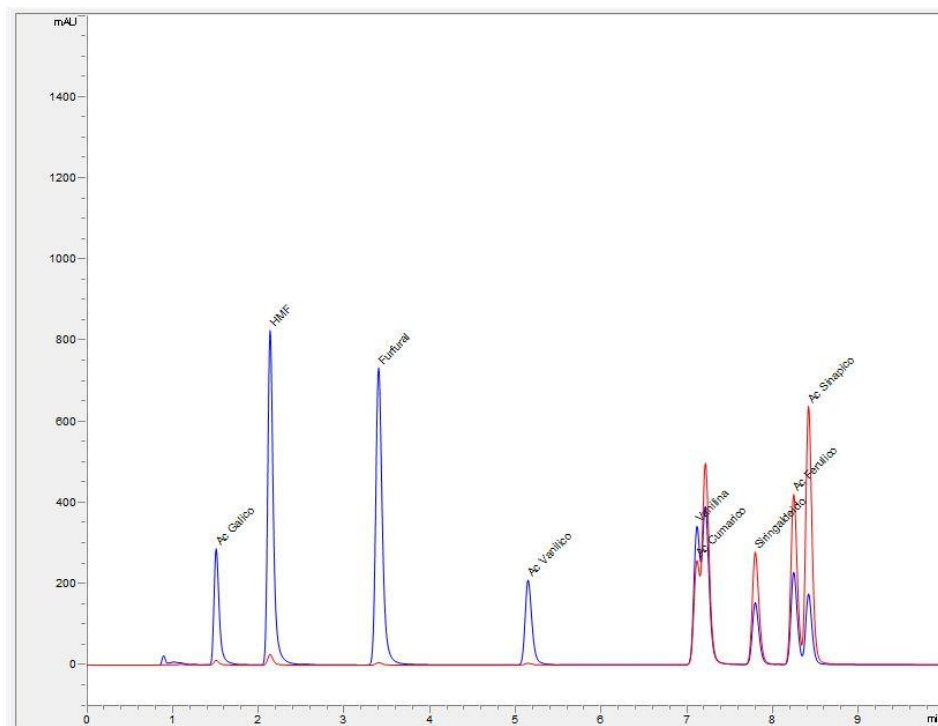


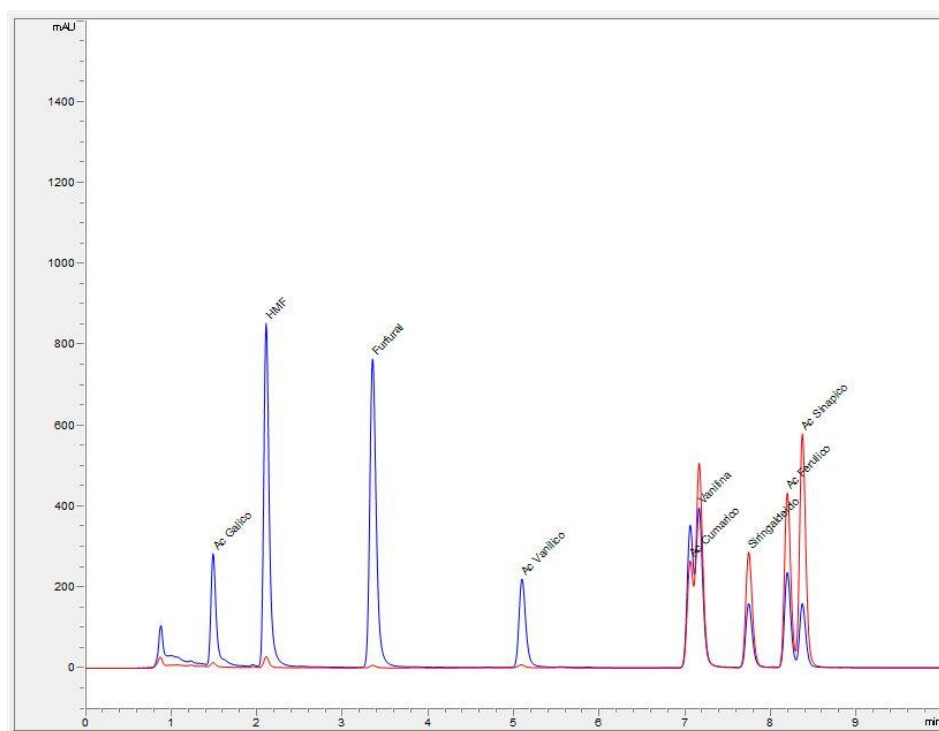
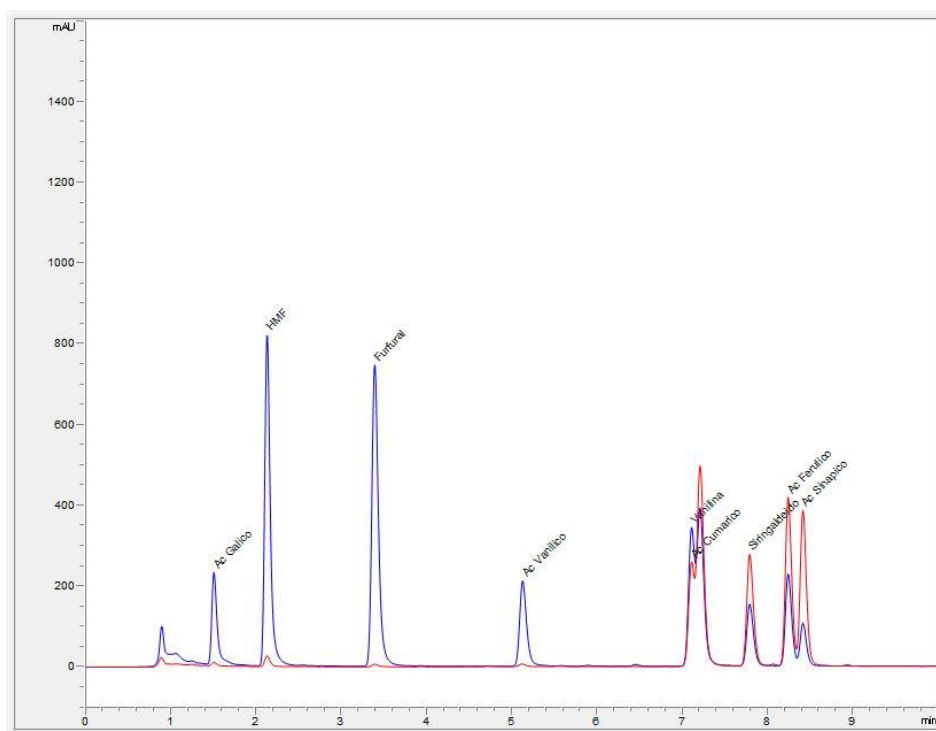
APENDICE B – Cromatogramas obtidos com o experimento de simulação de hidrólise, para verificar ação dos extratos na redução de compostos fenólicos e inibidores (Capítulo 3)

DAD – A – Controle (Padrões)

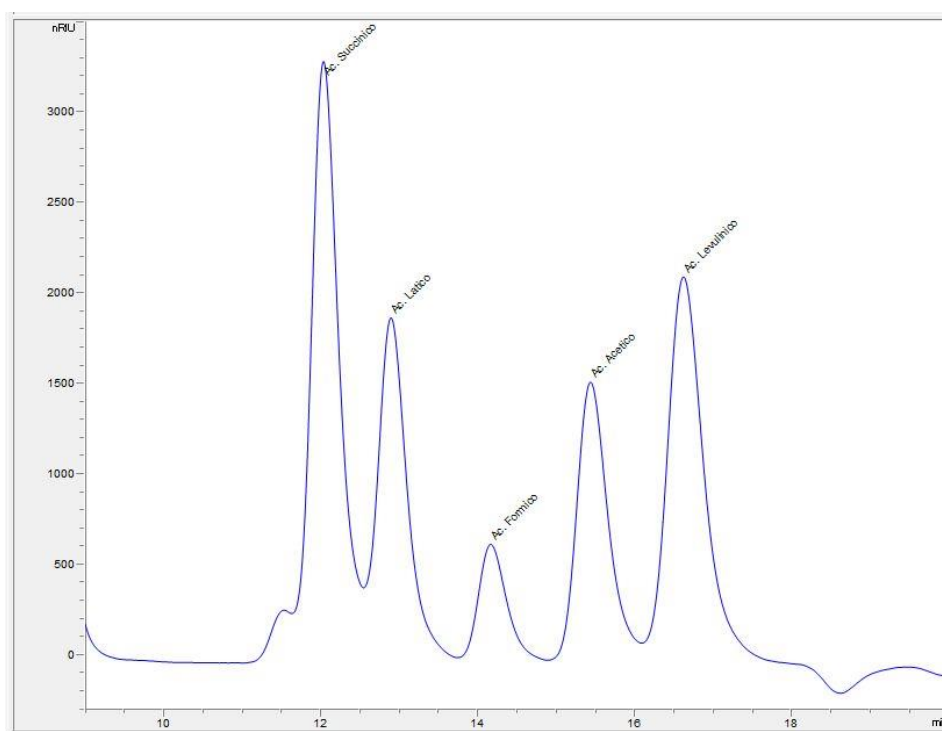
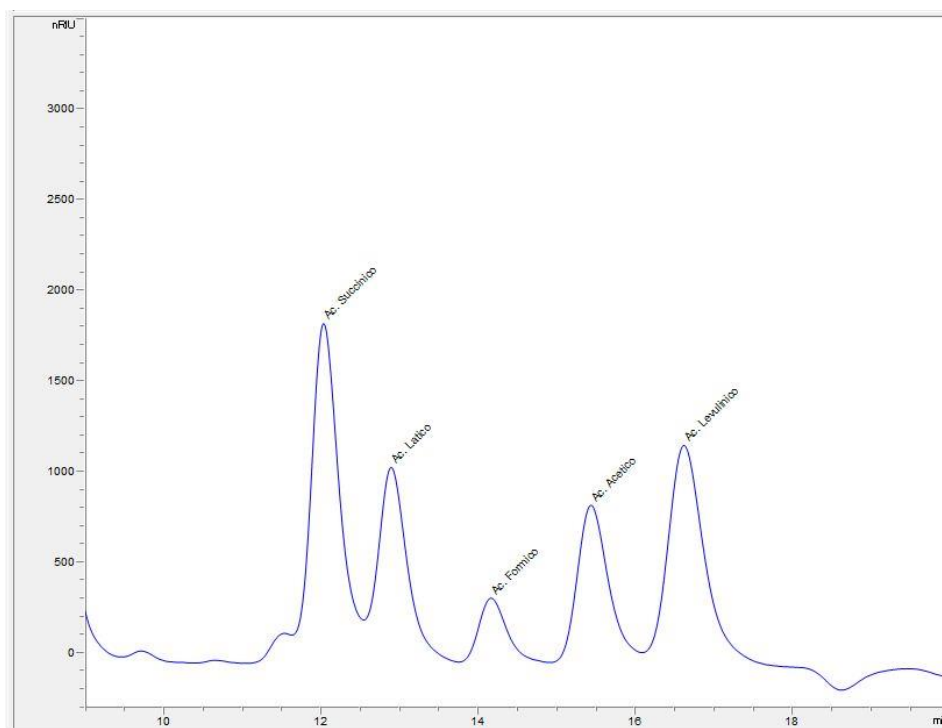


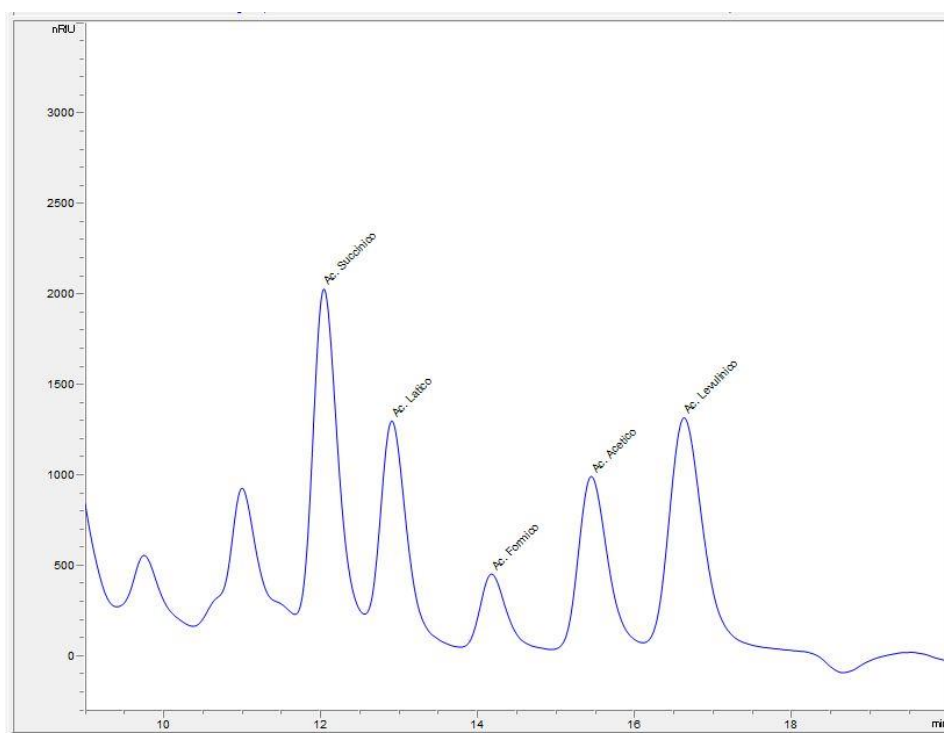
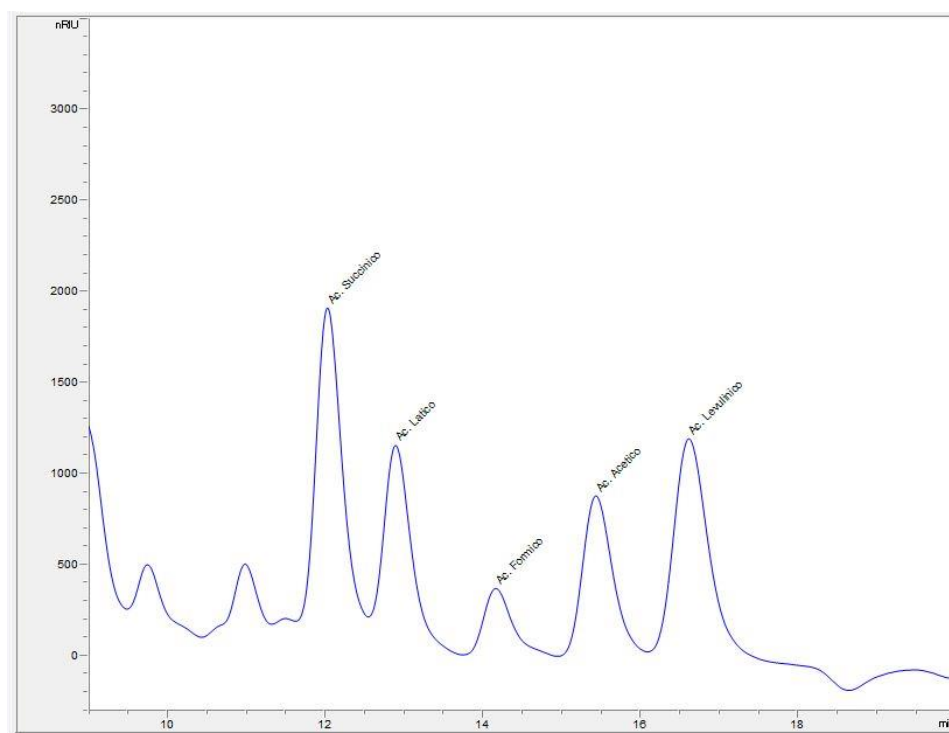
DAD – B - (Tr+Aa)



DAD – C – [(Tr+Aa) + *Flavodon flavus* FPB 04]**DAD – D - [(Tr+Aa) + *Fomes fasciatus* FPB 28]**

Legenda: Detector de arranjo de diodos (**DAD**). Picos em azul detecção a 280 nm e em vermelho a 320 nm.

RID – A - Controle (Padrões)**RID – B - (Tr+Aa)**

RID – C – [(Tr+Aa) + *Flavodon flavus* FPB 04]**RID – D – [(Tr+Aa) + *Fomes fasciatus* FPB 28]**

Legenda: **RID** – Detector de índice de refração

APENDICE C – Produção científica durante o doutorado (autoria e co-autoria)

Combinação de extratos enzimáticos de basidiomicetos e ascomicetos para hidrólise do cacho vazio de dendê

Elias Alves da Silva¹, Thályta Fraga Pacheco², Thais Demarchi Mendes³,
Marivane Lemos⁴, Felipe B.P. Carvalho⁵, Léia Cecília de Lima Favaro⁶, Simone
Mendonça⁷, Felix Gonçalves de Siqueira⁸, Manoel Teixeira Souza Júnior⁹

Resumo

A cadeia de produção e uso do dendê (*Elaeis guineensis*) tem buscado se alinhar à lógica de biorrefinaria, visando à sustentabilidade e competitividade do setor. Nesse contexto, o aproveitamento integral de resíduos para a geração de outros produtos de maior valor agregado ganha relevância. Os cachos vazios são abundantes resíduos lignocelulósicos dessa cadeia. Na natureza, os basidiomicetos degradam eficientemente os componentes estruturais da parede celular vegetal, em função do arcabouço enzimático, enquanto alguns fungos filamentosos são eficientes em determinado componente. O presente estudo objetivou verificar a capacidade lignolítica e hidrolítica de extratos enzimáticos de basidiomicetos (coleção Embrapa Agroenergia – FPB), combinados com extratos de dois ascomicetos *Trichoderma reesei* ATCC60787 (Tr) e *Aspergillus aculeatus* F-50 [NBRC108796] (Aa), sobre o cacho vazio de dendê pré-tratado (autohidrólise). Os basidiomicetos FPB's 26; 28; 102; 104; 109; 115 e 116 foram cultivados sobre o cacho vazio (fermentação estado sólido), para obtenção dos extratos. Os Ascomicetos *T. reesei* ATCC 6087[®] e *A. aculeatus* F-50 [NBRC108796][™] foram cultivados em condição submersa em meio Mandels Weber (1969), suplementado com 2,5 % de borra (sólido obtido no tridecantador de óleo de dendê), para também obtenção de extratos. A hidrólise foi realizada em placas tipo *Deep Well* contendo 0,45g de fibra e 6 mL da mistura constituída por extratos, tampão e água destilada por poço. Os resultados evidenciaram maiores teores de glicose nas misturas contendo extratos de *T. reesei* e *A. aculeatus* e FPB's 109; 115e 116, levando à produção de (2,73 g. L⁻¹), (2,38 g. L⁻¹) e (2,58 g. L⁻¹), respectivamente.

Palavras-chave: fungos de podridão-branca. agroindústria do dendê. coquetel enzimático. açúcares solúveis.

Ação de macrobasidiomiceto na desconstrução do cacho vazio de dendê

Elias Alves da Silva¹, Thais Demarchi Mendes², Thalyta Fraga Pacheco³, Raquel Bombarda Campanha⁴, Simone Mendonça⁵, Félix Gonçalves de Siqueira⁶, Manoel Teixeira Souza Junior⁷

Resumo

A palma (*Elaeis sp.*) é a cultura de maior produtividade de óleo por área cultivada dentre as plantas oleaginosas empregadas comercialmente. A gordura extraída desta planta é o óleo vegetal mais consumido no mundo. Entretanto, a dendecultura produz anualmente milhões de toneladas de resíduos como, por exemplo, os cachos de frutos vazios. O aproveitamento desses resíduos para geração de bioprodutos de valor agregado, tais como açúcares solúveis ou químicos renováveis, requer processos de pré-tratamentos das biomassas. O pré-tratamento biológico, utilizando macrobasidiomicetos/macrofungos, pode se destacar devido à capacidade de produção de enzimas lignolíticas, como lacases e peroxidases, que atuam na desconstrução das estruturas recalcitrantes da biomassa lignocelulósica. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar (i) o pré-tratamento biológico do cacho vazio de dendê pelo basidiomiceto FPB115 e (ii) a influência da combinação do extrato bruto enzimático (EBE) com coquetel celulolítico comercial na hidrólise desta biomassa pré-tratada por auto-hidrólise. O FPB 115, pertencente à coleção "Microorganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias" (CMMAABio), foi cultivado em cacho de dendê triturado (fermentação no estado sólido) durante 15 dias a 28 °C. Após a colonização, uma triplicata foi congelada, liofilizada e triturada para caracterização da composição química da biomassa e sacarificação. Outra triplicata foi utilizada para obtenção do EBE-FPB115, que, juntamente com enzimas comerciais, foi adicionado ao cacho pré-tratado hidrotermicamente. O pré-tratamento biológico do cacho pelo FPB115 promoveu redução de 1,86% de lignina e 5,72% de celulose comparado ao material sem pré-tratamento. A sacarificação deste material realizada com Cellic[®] CTec3 (Novozymes[®]), resultou, após 24 horas, na liberação de 0,6 g.L⁻¹ de glicose e 1,4 g.L⁻¹ de xilose, o que corresponde, respectivamente, a 3,5% e 16% de conversão. Utilizando o cacho pré-tratado por auto-hidrólise, não se observou elevação dos teores de glicose e xilose liberados quando combinado EBE-FPB115 com enzimas comerciais Celluclast e celobiose (0,65% e 0,35% de 12,5 mg de proteína respectivamente). Os resultados indicam que o pré-tratamento biológico do cacho com FPB115 promove redução da lignina e favorece a sacarificação. Contudo, nas condições testadas, o EBE-FPB115 juntamente com enzimas comerciais não melhorou a hidrólise do cacho pré-tratado. É importante ressaltar que fatores como o tempo de cultivo e tipo de biomassa podem influenciar no aumento/diminuição das variáveis analisadas, incentivando mais investigações.

Auxílio Financeiro: Finep (01.13.00315.00), Capes.

Palavras-chave: dendecultura, pré-tratamento biológico, açúcares fermentescíveis, biorrefinaria.

¹ Biólogo, mestre em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, doutorando em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA) / Capes-Embrapa, elias.silva@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

³ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, Analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁴ Química, mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁷ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, manoel.souza@embrapa.br

Produção de polióis por fungos filamentosos cultivados em glicerina bruta sob diferentes condições de luz

Samira Costa Braga¹, Elias Alves da Silva², Viviany Nayse Belo Silva³, Thaís Fabiana Chan Salum⁴, Sílvia Belém Gonçalves⁵

Resumo

A glicerina bruta, principal coproduto da indústria do biodiesel, tem sido gerada em grandes volumes, e o excesso faz com que seu valor de mercado seja cada vez menor. Muitas indústrias não conseguem realizar uma destinação correta da glicerina bruta produzida, e seu descarte indevido pode levar a danos ambientais. Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas visando agregar valor a esse coproduto. Nesse contexto, a utilização de fungos filamentosos, que sabidamente são capazes de consumir a glicerina bruta e produzir metabólitos com diversas aplicações, vem sendo estudada. Um dos produtos obtidos a partir da conversão da glicerina são os polióis, álcoois poli-hídricos com aplicações na indústria farmacêutica, química e de alimentos. Estudos demonstraram que a luz e seus diferentes comprimentos de onda influenciam na reprodução, crescimento e na produção de metabólitos pelos fungos filamentosos. Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de polióis por fungo filamentosos, utilizando a glicerina bruta como substrato e três condições de luz durante a incubação. O isolado (GBB8) pertence à coleção "Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias" (CMMAABio), da Embrapa Agroenergia. O fungo foi cultivado durante 10 dias em meio Czapeck, utilizando glicerina bruta como única fonte de carbono. Para a incubação, foram utilizadas as condições: luz natural, luz azul e ausência de luz (escuro). Para a quantificação dos polióis, foram realizadas análises por cromatografia líquida de ultra alta performance (UPLC). A análise de variância indicou que não houve diferença significativa quando comparado o cultivo na presença de luz natural e na ausência de luz (escuro). Sendo os valores obtidos para o treitol de 0,42 g.L⁻¹ e 0,39 g.L⁻¹ na condição de luz natural e na ausência de luz (escuro), respectivamente. No entanto, ao comparar as condições de cultivo ausência de luz (escuro) e luz azul, houve diferença significativa, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), os valores obtidos de treitol foram de 0,4 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹ na condição de ausência de luz e na luz azul, respectivamente. Desse modo, os resultados indicaram que a luz azul exerce influência sobre o metabolismo do fungo nas condições testadas, porém mais estudos são necessários para aumentar a bioconversão da glicerina bruta em polióis.

Auxílio Financeiro: Biogic, Capes.

Palavras-Chave: bioconversão. metabolismo fúngico. fungos filamentosos. polióis.

¹ Engenheira de alimentos, doutoranda em Tecnologias Químicas e Biológicas pela Universidade Federal de Brasília, samiracostabraga@hotmail.com.

² Biólogo, doutorando em Biotecnologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras, elias.silva@colaborador.embrapa.br.

³ Bióloga, doutoranda em Biotecnologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras, viviany.silva@colaborador.embrapa.br.

⁴ Farmacêutica, doutora em Ciências (Biotecnologia), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br.

⁵ Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br.

Enhancement of ligninolytic enzyme activities in an *Aspergillus terreus* co-culture with macrofungi

Aparecido Almeida Conceição¹, Elias Alves da Silva², Paula Andrea Osorio Carmona³, José Antônio de Aquino Ribeiro⁴, Nádia Skarupa Parachin⁵, Simone Mendonça⁶, Félix Gonçalves de Siqueira⁷

Abstract

Co-cultivation is a potential strategy in lignocellulolytic biodegradation with producing high activity enzymes due to synergic or stress action between two or more microorganism species. The objective of this study was to investigate the effect of different days co-culturing of two fungi on laccase and peroxidase production using cottonseed cake (CSC) as substrate. Spores of *Aspergillus terreus* ATCC20542 (1×10^7) were firstly inoculated in 50 mL of liquid medium contain basal components (yeast extract, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO})_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, MnCl_2 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and 7% of CSC. After 0, 1, 3 and 7 days of *A. terreus* in monoculture growth, mycellium of *Panus lecomtei* CC40 or *Fistulina hepatica* CC102 were inoculated for co-culture period. The laccase and peroxidase activities were evaluated after 0, 1, 3, and 7 days of co-culturing incubation. The highest increases of laccase ($1085.82 \pm 54.75 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) and peroxidase ($685.40 \pm 87.30 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) activities were seen in co-cultures with CC40 after 3 and 7 days, respectively; both result observed when CC40 was inoculated in CSC medium containing *A. terreus* growing for seven days in monoculture. When co-cultured *A. terreus* and CC102, laccase activity increase to $943.69 \pm 55.04 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ and peroxidase highest activity was only $3.59 \pm 1.55 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ after 3 and 1 day of co-culture, respectively; both, also, when cultured in medium contained *A. terreus* growing for seven days in monoculture. These levels of activity were significantly different from the enzyme activity when the two fungi species were growing in monoculture. *P. lecomtei* appeared to possess specific potential to be used in co-cultured production of oxidative enzymes. The production of laccase and peroxidase was not only dependent on the species of macrofungi used for co-culture but also regulated by different days of each fungi inoculation. In conclusion, interaction between *A. terreus* and *P. lecomtei* improves laccase and peroxidase activities. The inoculation time of *P. lecomtei* on *A. terreus* culture plays an important role in the laccase and peroxidase enhancement.

Auxílio Financeiro: CNPq (404786/2013-8), Fapesb, Capes.

Keywords: cottonseed cake. fungal co-culture. macro-basidiomycets. oxidases.

¹ Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal do Bahia, cido1991@hotmail.com.

² Biólogo, doutorando em biotecnologia vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA)/Capes-Embrapa elias.silva@colaboradorembrapa.br

³ Agrônoma, doutora em Agronomia, Universidade de Brasília, osorio.carmona@gmail.com.

⁴ Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas, Analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁵ Bióloga, doutora em Engenharia Metabólica, pesquisadora Universidade de Brasília, radiap@gmail.com.

⁶ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br.

⁷ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

Desenvolvimento de protocolo para imagem química por espectrometria de massas de metabólitos-microrganismos

Tallyta Santos Teixeira¹, Jorge Candido Rodrigues Neto², Pedro Alves Martins², Elias Alves da Silva³, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa⁴, Thais Fabiana Chan Salum⁵, Félix Gonçalves de Siqueira², Patrícia Verardi Abdelnur⁶

Resumo

A complexa interação dos microrganismos entre si e com o ambiente é mediada por diversos metabólitos, que têm muitas aplicações industriais. Nesse contexto, a imagem química por espectrometria de massas pode auxiliar estudos de prospecção de novos compostos por permitir informações complementares através da determinação espacial dos metabólitos. Dentre as técnicas utilizadas, tem-se a MALDI-IMS (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization – Imaging Mass Spectrometry*), que exige desenvolvimento de métodos adequados para o preparo e análise da amostra. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para MALDI-IMS de metabólitos em microrganismos. Foram testadas formas de inoculação (contato e suspensão), cultivo do microrganismo (direto na lâmina para MALDI-IMS e por transferência), tipo de matriz (DHB e HCCA) e forma de aplicação da matriz escolhida (por sublimação, seguida ou não de recristalização com ácido acético 5%, e por micropipeta). A bactéria CNPAE 99 (579) da coleção "Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias" (CMMAABio) foi cultivada em placas de Petri por 24 h a 28 °C. Em seguida, o material foi desidratado por 2 h, submetido à aplicação de matriz e analisado por MALDI-IMS. Percebeu-se que a inoculação realizada por suspensão permitiu um crescimento mais uniforme e reprodutível da colônia se comparado com o contato direto. A forma de cultivo diretamente na lâmina para MALDI-IMS foi mais eficaz do que a transferência da colônia para esta, devido à facilidade do manuseio do material biológico. Ao comparar as matrizes, observou-se que o DHB aplicado por sublimação permitiu uma rápida (5 min) e uniforme deposição da matriz. Porém, nenhuma imagem química de metabólitos foi obtida nessa condição. Já a utilização de HCCA acarretou em uma lenta (20 min) e uniforme deposição de matriz sobre as amostras. Neste caso, seis íons (m/z 520,1; 524,4; 563,4; 568,6; 591,9 e 625,5) tiveram sua localização química determinada. Destes, o íon m/z 568,6 refere-se à matriz HCCA e os demais íons serão investigados por UHPLC-MS/MS. A matriz HCCA apresentou melhores resultados e por isso foi testada quanto à forma de aplicação, avaliando a distribuição espacial do íon m/z 568,6 em cada método. Dentre os métodos avaliados, a aplicação do HCCA por sublimação apresentou uma distribuição uniforme em toda amostra, enquanto os demais métodos apresentaram localização pontual. Uma otimização de parâmetros instrumentais se faz necessária para esse protocolo, porém o MALDI-IMS se mostra promissor para fins de prospecção de novos metabólitos de microrganismos.

Auxílio Financeiro: Capes.

Palavras-chave: MALDI-IMS. metabolômica. microrganismos.

Enzimas lignolíticas de macrobasidiomicetos cultivados em torta semente de algodão combinados com casca de coco verde

Ramário Oliveira Paiva¹, Helene Pereira Marques², Elias Alves da Silva³, Manoel Teixeira de Souza Junior⁴, Simone Mendonça⁵, Félix Gonçalves de Siqueira⁶

Resumo

Alguns macrobasidiomicetos/macrofungos são capazes de degradar substâncias tóxicas presentes em insumos para nutrição animal, tais como tortas de sementes de pinhão-mansão, algodão, mamona, entre outras. Além da biodetoxificação, há outras vantagens no tratamento biológico de biomassas vegetais com macrofungos, tais como: aumento da digestibilidade/designificação e enriquecimento com bioativos e enzimas secretadas. Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de crescimento de macrofungos e produção de ligninases (lacases e peroxidases totais) quando cultivados em substratos à base de casca de coco verde (CCV) combinado com torta de caroço de algodão (TCA), enriquecidos com grãos triturados de milho, trigo e amaranto (integral). Um total de 7 formulações de substratos foram elaborados para o cultivo de 8 macrofungos (fermentação em estado sólido - FES) por 28 dias. Os macrofungos utilizados no estudo foram *Panus lecomtei* CCD40, *Pleurotus pulmonarius* EF88, *Pleurotus ostreatus* CC389, *Fistulina hepatica* CC102, *Picnoporus sanguineus* FPB134, *Fomes* sp. FPB028, *Schizophyllum commune* FPB109 e *Oudemansiella canarii* CCD37 pertencentes à coleção "Microorganismos e Microalgas Aplicadas à Agroenergia e Biorrefinarias" – CMMAABio. Os macrofungos com melhor crescimento na maioria dos substratos testados foram CC389, FPB109 e CCD37. O CC389 colonizou totalmente todos os substratos (7/7) aos 28 dias, sendo que, em seis dos substratos, levou apenas 23 dias para colonizá-los completamente. O FPB109 apresentou crescimento micelial significativo, colonizando todos os substratos, levando em média 24 dias de crescimento total para 4/7 substratos. Os macrofungos CC389, EF88 e FPB109 apresentaram os melhores resultados para atividade de lacase quando cultivados no substrato contendo a mistura de CCV (25%) + TCA (25%) + semente de milho triturado (50%). Os valores de lacases obtidos desses cultivos variaram entre 600 U.g⁻¹ e 1.200 U.g⁻¹. O CC389 também apresentou os melhores resultados para peroxidases totais em 5/7 dos substratos avaliados, chegando a atingir 350 U.g⁻¹ no substrato com CCV (25%) + TCA (25%) + semente de milho triturado (25%) + semente de amaranto integral (25%). Assim, pode-se inferir que algumas espécies de macrobasidiomicetos podem ser usadas para a produção de enzimas lignolíticas apresentando diferença de eficiência em diferentes tipos de combinações de substratos vegetais. Além disso, abre-se a perspectiva para o uso de biomassas vegetais previamente enriquecidas com micélio vegetativo, enzimas e bioativos dos macrofungos, como insumos para nutrição animal, pela prévia desconstrução parcial das fibras. Novos estudos serão realizados visando avaliar a detoxificação e alteração da composição bromatológica dos tratamentos mais promissores.

Auxílio Financeiro: CNPq (404786/2013-8), Capes, Embrapa, Finep.

Palavras-chave: macrofungos, enzimas descontrutoras de parede celular vegetal, biotecnologia.

¹ Graduando em Farmácia, Universidade de Brasília, ramario.paiva@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, helene.marques@colaborador.embrapa.br

³ Biólogo, doutorando em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, elias.alves@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, Embrapa Agroenergia, manoel.souza@embrapa.br

⁵ Farmácia, doutor em Clínica da Saúde, Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Biologia Molecular/Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

Enzimas desconstrutoras de parede celular vegetal secretadas por macrobasidiomicetos cultivados em cacho vazio de dendê

Dulce Cristine dos Santos¹, Elias Alves da Silva², Thais Demarchi Mendes³, Thálya Fraga Pacheco⁴, Manoel Teixeira de Souza Junior⁵, Simone Mendonça⁶, Félix Gonçalves de Siqueira⁷

Resumo

O óleo de dendê (óleo de palma) é um produto de grande importância econômica mundial, tendo mais de 90% da sua produção no Brasil localizada no Estado do Pará. O processo de extração do óleo de dendê apresenta de modo geral rendimento de 10% em relação a toda biomassa vegetal gerada desde o cultivo até o processamento dos frutos. O cacho vazio de dendê consiste em cerca de 60% de resíduo sólido processado. Deste modo, a agroindústria de dendê necessita de alternativas para o aproveitamento desses resíduos/subprodutos, de forma a obter produtos de valor agregado. O pré-tratamento biológico mediante cultivo de macrofungos por fermentação em estado sólido de biomassas lignocelulósicas tem potencial para gerar bioprodutos como cogumelos comestíveis, insumos para nutrição animal, açúcares fermentescíveis, bioativos microbianos e enzimas degradadoras de parede celular vegetal, que têm apelo biotecnológico para diferentes setores industriais. Diante disso, este trabalho teve como objetivo determinar o perfil enzimático de 9 espécies de macrobasidiomicetos e um ascomiceto (FCC94) cultivados por fermentação em estado sólido (FES) em cacho vazio de dendê triturado. Os fungos pertencem à coleção "Microorganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias" – CMMAABio. Os extratos enzimáticos foram obtidos nos tempos de 6, 13 e 21 dias de fermentação e foram analisados em relação ao teor de proteínas solúveis totais, proteases e peroxidases totais. O ascomiceto FCC94 foi o que apresentou maior atividade de protease (3.000 UI mL^{-1}) e esteve entre os fungos com as maiores atividades de peroxidases totais (FPB109, FPB125 e FCC94), valores próximos de 20 UI g^{-1} . De modo geral, os fungos avaliados apresentaram melhores resultados quanto às atividades das enzimas da classe peroxidases, mostrando grande potencial para aplicação biotecnológica em processos de pré-tratamento da biomassa vegetal, facilitando a obtenção de açúcares fermentescíveis após a desconstrução da lignina, fator limitante de bioprocessos de hidrólise enzimática, por exemplo. Já as proteases possuem grande aplicação nas indústrias alimentícias, em processos de clareamento na fabricação de detergentes e outros processos industriais.

Auxílio Financeiro: Finep (01.13.00315.00), Capes, Embrapa.

Palavras-chave: biorrefinaria, biomassa vegetal, agroindústria, palma de óleo (dendê), basidiomicetos, pré-tratamento biológico.

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade de Brasília, dulce.santos@colaborador.embrapa.br.

² Biólogo, mestre em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, doutorando em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA)/Capes-Embrapa, elias.silva@colaborador.embrapa.br.

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br.

⁴ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalya.pacheco@embrapa.br.

⁵ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, manoel.souza@embrapa.br.

⁶ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br.

⁷ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br.



Whole genome sequence of two white-rot fungi that degrade residual biomass from the Oil Palm industry

Elias Alves da Silva^{1,2}; André Pereira Leão²; Félix Gonçalves de Siqueira²; Manoel Teixeira Souza Junior^{1,2}

Institution: ¹Universidade Federal de Lavras (UFLA); ²Embrapa Agroenergia.

Contact E-mail: elias.silva@colaborador.embrapa.br

Key-words: White-rot fungi; biological pretreatment; genome assembly

ABSTRACT:

The oil palm (*Elaeis guineensis*) industry generates a significant amount of lignocellulosic residual biomass. In order to increase the environmental and economic sustainability of this agro-industry, it is necessary to reduce the amount of residual biomass generated by adding value to it. White rot fungi efficiently degrade lignin, a recalcitrant polymer in wood that is among the most abundant natural materials on the environment, and which is present in most of the solid residual biomass from the oil palm industry. These fungi have extracellular oxidative enzymes (laccases and peroxidases) able to deconstruct aromatic compounds from lignin. After selecting two strains of white rot fungi (FPB 04 and FPB 28), based on their ability to produce laccases and peroxidase of their enzymatic extracts to hydrolyze the empty fruit bunches and release fermentable sugars, we have started a hybrid de novo assembly strategy to sequence the genome of these two strains. The first step in the strategy was to sequence DNA using the Illumina HiSeq2500 platform, in order to generate short DNA reads (150 nucleotides long). Here we present the results from this first step, where a total of 6.45 and 5.94 Gigabases of data were generated for FPB 04 and FPB 28, respectively. After a FASTQC analysis, these data were submitted to a preliminary assembly using the SPAdes software (version 3.11.1), resulting in 19,910 scaffolds with a N50 length of 3,191 bp for FPB 04; and in 14,779 scaffolds with a N50 length of 4,159 bp for FPB 28.



Biomass utilization of *Portulaca oleracea* L. under salt stress for macrobasidiomicetos growth

Elias Alves da Silva^{1,2}; Vivianny Nayse Belo Silva^{1,2}; Mariana Resende Alvim³; Beatriz Leite³; Félix Gonçalves de Siqueira²; Manoel Teixeira Souza Junior^{1,2}

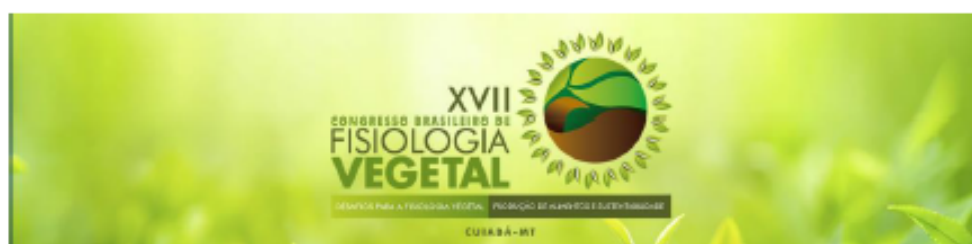
Institution: ¹Universidade Federal de Lavras; ²Embrapa Agroenergia; ³Universidade Federal de São João del-Rei

Contact E-mail: viviannybiologa@gmail.com

Key-words: Salinity. Purslane. Biomass pretreatment. Culture medium.

ABSTRACT:

Portulaca oleracea L. (Purslane) is a halophyte species highly tolerance to salinity stress. Purslane access B1 is highly tolerant to NaCl levels up to 1.0 g/100 g of a fresh substrate, without great losses in biomass production. Macro-basidiomycetes present great potential for application in the pretreatment of lignocellulosic biomass. This study aimed to evaluate the mycelia growth and enzymes production for ten macro-basidiomycetes, belonging to the CMMAABio collection, cultivated on growth medium having biomass from Purslane plants (grown or not under saline stress) as the only carbon source. Standard BDA and BD media were used as control. Mycelium discs were inoculated and let to grow at 28°C in the growth chamber for 15 days. All 10 fungi tested experienced some mycelium growth when cultivated for 15 days on all three media used. FPB04 and FPB28 accesses presented the highest values in colony diameter (mm) when growing on medium with purslane biomass grown in saline condition (66.83 and 67.50 mm, respectively) for 15 days. FPB04 had similar values in colony diameter after growing for 15 days on all three media; while FPB28 has higher values when comparing to the other two media used. Laccase activity was observed in five of the 10 fungi evaluated; however, CS7 and EF88 presented higher activity in purslane biomass grown in saline condition than in BD (control). Thus, in vitro results indicate that the biomass of purslane presents a potential for cultivation of macro basidiomycetes allowing both the use of biomass for growing edible mushrooms.



Effect of salt stress on the photochemical apparatus of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud.

Silva VNB^{1,2}, David MFL³, Silva EA^{1,2}, Casari RACN¹, Ferreira TMM^{1,2}, Sousa CAF¹, Souza Jr MT¹

¹Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, Brazil; ²Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil. thalita.massaro@colaborador.embrapa.br; ³Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

Gliricidia sepium (Jacq.) Steud. (gliricídia) is a tree belonging to the family Fabaceae, which has the ability to fix nitrogen. It has been used as live fencing, firewood, green manure and intercropping. However, its noblest use is as fodder for cattle, since its leaves present a high protein content. Due to its tolerance to drought, it has been grown in the Brazilian Northeast, where drought is a natural phenomenon. Besides drought episodes, the soils of that region are prone to salinization. However, the behavior of this species when submitted to salt stress is still incipient, although it has already aroused some curiosity. In this study, we evaluated the effect of salt stress on the photochemical apparatus of gliricídia. Thus, three-month-old seedlings grown in plastic pots (4 kg) were submitted to doses of 0.0, 0.4, 0.6, 0.8 e 1.0 g NaCl/100 g of substrate. The first three days after imposition of the salt stress, it was observed an increase in initial fluorescence (F_o), a decrease in maximum fluorescence (F_m), which resulted in a drop in the maximum quantum yield of photosystem II (F_v/F_m) for the doses ≥ 0.6 g NaCl. The stress was so strong that on the 4th day all plants subjected to those salt doses presented completely wilted leaves, which then fell off. About a month later, the plants developed new foliage. At 35 and 45 days of salt stress, new measurements showed that F_v/F_m had completely recovered at doses of 0.6 and 0.8 g NaCl. Therefore, instead of expending energy to recover the photochemical apparatus from the pre-existing leaves, the plants invest in new leaves that have already been equipped with mechanisms to protect the photochemical apparatus from saline stress.

Keywords: abiotic stress, salt tolerance, gliricídia.



Metabolismo antioxidante de *Setaria viridis* acesso A10.1 em resposta ao parasitismo de espécies de *Meloidogyne* (Antioxidant metabolism of *Setaria viridis* access A10.1 in response to parasitism of *Meloidogyne* species)

Mariana Ferreira de Lima David¹; Vivianny Nayse Belo Silva²; Elias Alves da Silva²; Thais Fernanda da Silva Vicente¹; Carlos Antônio Ferreira de Sousa³; Elvira Maria Regis Pedrosa¹; Manoel Teixeira Souza Junior³; Lilian Margarete Paes Guimarães¹. ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE); ²Universidade Federal de Lavras (UFLA); ³Embrapa Agroenergia. Email: marif.agro@gmail.com

Resumo: Os nematoides do gênero *Meloidogyne* estão entre os patógenos de plantas mais prejudiciais do mundo ocasionando diversas perdas. É interessante a busca por medidas de controle que visem a sustentabilidade, como plantas geneticamente resistentes com capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs) em função do estresse oxidativo ocasionado pela infecção. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar as respostas enzimáticas diante do parasitismo de *Meloidogyne* spp. em *Setaria viridis* acesso A10.1. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agroenergia – Brasília, DF. As avaliações foram fundamentadas na atividade de enzimas do sistema antioxidante e foram realizadas aos 10 e 20 dias após inoculação de 10.000 e 20.000 ovos e juvenis de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*, e em plantas não inoculadas (testemunha). As folhas coletadas foram processadas para obtenção das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e fenilalanina amônia liase (PAL). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à MANOVA com medida repetida no tempo. Não foi possível observar atividade da SOD e CAT, em contraste, as atividades da APX e da PAL foram crescentes ao longo do tempo. Não houve interação entre as espécies inoculadas e a atividade da APX. As espécies inoculadas não mostraram relação quanto à atividade PAL no tempo, mas as densidades de inóculo de 10.000 e 20.000 obtiveram diferença significativa ($P < 0,01$). As interações entre o tempo e espécie e, tempo e tratamento foram significativas ($P < 0,05$) para a atividade da PAL. Esta enzima está relacionada com respostas de plantas a diferentes estresses. Dessa forma, os resultados sugerem que nas condições testadas *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* promoveram resposta bioquímica, através da atividade da PAL, em *S. viridis* acesso A10.1. Além disso, *S. viridis* acesso A10.1 se mostrou como possível planta antagonista, ao apresentar atividade enzimática da PAL, que atua sob estresse ou estando envolvida na biossíntese de compostos fenólicos como substâncias repelentes aos nematoides-das-galhas.

Palavras-chave: Nematóide-das-galhas; *Setaria viridis*; Caracterização enzimática
Apoio: CNPq; Embrapa; CAPES.



Respostas do parasitismo de *Meloidogyne* spp. em *Setaria viridis* acesso A10.1 (Responses of the parasitism of *Meloidogyne* spp. in *Setaria viridis* access A10.1)

Mariana Ferreira de Lima David¹; Vivianny Nayse Belo Silva²; Elias Alves da Silva²; Thais Fernanda da Silva Vicente¹; Carlos Antônio Ferreira de Sousa³; Elvira Maria Regis Pedrosa¹; Manoel Teixeira Souza Junior³; Lilian Margarete Paes Guimarães¹.

¹UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; ²UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS; ³EMBRAPA AGROENERGIA. Email: marif.agro@gmail.com

Resumo: Os nematoides do gênero *Meloidogyne* causam muitos danos econômicos em diversas culturas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o parasitismo de *Meloidogyne* spp. em *Setaria viridis* acesso A10.1, para utilização como potencial planta modelo nos estudos de resistência aos nematoides das galhas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agroenergia – Brasília, DF. As populações utilizadas no experimento foram caracterizadas revelando os fenótipos *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii*. As avaliações foram realizadas aos 10, 20 e 30 dias após inoculação (DAI) de 10.000 e 20.000 ovos e juvenis de nematoides, e em plantas não inoculadas (testemunha). Tomateiros cultivar Santa Cruz Kada foram utilizados como padrão de suscetibilidade. Para realização das avaliações, o sistema radicular foi cuidadosamente lavado e pesado (PFSR). Quanto à penetração e desenvolvimento dos fitonematoides realizou-se nos tempos de 10 DAI e 20 DAI e para determinar a reprodução dos nematoides a avaliação foi realizada aos 30 DAI. Também no mesmo período foram determinados: fator de reprodução (FR), número de ovos por planta (NO), índice de galhas (IG) e índice de massa de ovos. Os dados foram submetidos à MANOVA com medida repetida no tempo. O PFSR apresentou médias reduzidas. Foi possível observar diferença significativa ($P < 0,01$) quanto às espécies inoculadas e às densidades de inóculos utilizadas influenciando o PFSR. Em todos os tempos de avaliação não foi possível observar a presença de juvenis e adultos das espécies em estudo no interior das raízes de *S. viridis* acesso A10.1, considerando-se uma planta não hospedeira dos nematoides das galhas. Como também, foi possível observar que *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* não se reproduziram ao final do experimento apresentando $FR=0$ (imune) e valores nulos de NO, IG e IMO. Nos tomateiros cv. Santa Cruz foi possível observar a reprodução do patógeno com fator de reprodução maior que um ($FR > 1$). Os resultados deste trabalho possibilitam um maior conhecimento sobre a relação entre *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* e *S. viridis* acesso A10.1 provando ser uma planta não hospedeira dessas espécies de nematoides-das-galhas não se qualificando como uma potencial planta modelo nos estudos de resistência.

Palavras-chave: Parasitismo; *Meloidogyne* spp.; *Setaria viridis*