



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**CARACTERIZAÇÃO DE MANANASES PRODUZIDAS POR *Clonostachys*
byssicola QUANDO CRESCIDO EM CASCA DE GRÃO DA SOJA**

DIANDRA ALBUQUERQUE LOPES COSTA

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Pós-Graduação em Biologia Microbiana

DIANDRA ALBUQUERQUE LOPES COSTA

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Biologia Microbiana da Universidade de
Brasília como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Doutora.

Brasília-DF, agosto 2021

**CARACTERIZAÇÃO DE MANANASES PRODUZIDAS POR *Clonostachys
byssicola* QUANDO CRESCIDO EM CASCA DE GRÃO DA SOJA**

DIANDRA ALBUQUERQUE LOPES COSTA

Banca Examinadora:

- ✓ Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale
- ✓ Prof. Dr^a. Dasciana de Sousa Rodrigues
- ✓ Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte
- ✓ Prof. Dr^a. Brenda Rabello de Camargo

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho – Orientador

Prof. Dr Aisel Valle Garay- Coorientador

Brasília, DF – agosto de 2021

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPDF.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas inúmeras vezes que Ele me deu forças para continuar...

Ao meu esposo Wilmar Costa que aguentou tantos anos de idas e vindas. Obrigada pelo apoio em todos os momentos. Te amo!

Ao meu orientador por me receber e pela disposição sempre. Obrigada por poder compartilhar um pouco do seu conhecimento.

Aos meus pais, Antonio e Emiliana, e meus irmãos, Veridiana, Jonatas e Diego. Ah... o que seria de mim sem vocês...

A minha vó Luiza que por muitos anos disponibilizou um cantinho para mim em sua casa. E pela minha tia Joanira, e cunhadas, Wilmara e Thalita, pelo suporte sempre que precisei de algo em Brasília.

Aos colegas do grupo “Edivas” foram bons tempos curtindo o laboratório cheio, deixo um agradecimento de coração a todos vocês: Caio, Carol, Raissa, Andreza, Lucas, Helder, Pedro, Leonora, Elenilde.

Um agradecimento especial ao Reynaldo, João e Marcelo por sempre me ajudarem nas horas dos perrengues.

Aos colegas do laboratório, Gabi, as duas Jéssicas, Raul, Phillippe, Isabel e todas aquelas pessoas que eu pude conhecer.

Aos professores da UnB que estiveram sempre de portas abertas para me ajudar, em especial o professor Luis, Aisel, Thomas, Janice, Leonardo, Bergman, Eliane e Krüger.

Agradeço por todas as pessoas que de alguma forma torceram para que isso desse certo...

Sumário

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT.....	VIII
CAPÍTULO I Introdução Geral	
INTRODUÇÃO	1
Chemical structure of mannan	5
Induction of microbial β -mannosidaseproduction by agricultural residues	5
Transcriptional induction of β -mannosidasegene expression	6
Hydrolysis reaction and mechanism of actionof β -mannosidases.....	6
Transglycosylation reactions catalyzedby β -mannosidases.....	7
Heterologous expression of β -mannosidases	8
Industrial applications of β -mannosidases	9
Pharmaceutical and food ingredientindustries	9
Detergent industry.....	10
Biofuel industry	10
Paper industry	11
Medicinal use	12
OBJETIVO	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
JUSTIFICATIVA	17
PROPOSTA DAS PRINCIPAIS METODOLOGIAS REALIZADAS NESTE TRABALHO ...	18

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO II CARACTERIZAÇÃO DE MANANASES.....	32
INTRODUÇÃO	32
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
PAREDE CELULAR	32
CELULOSE	34
HEMICELULOSE	35
PECTINA.....	37
LIGNINA.....	39
DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA POR FUNGUS	40
O GÊNERO Clonostachys.....	44
CASCA DE SOJA.....	45
OBJETIVO	46
MATERIAIS.....	46
MICROORGANISMO.....	46
SUBSTRATOS	47
METODOLOGIA.....	47
CULTIVO DO FUNGO	47
EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO NA INDUÇÃO DE MANANASES	47
Cultivos em frascos erlenmeyer.....	48
Meio de cultura.....	49
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONCENTRAÇÃO PROTEÍCA.....	50
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MANANASES	51
RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
OTIMIZAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE MANANASES.....	53
ULTRAFILTRAÇÃO.....	57
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	58
CONCLUSÕES E PERPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

CAPÍTULO III AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE <i>Clonostachys byssicola</i> PARA A SACARIFICAÇÃO DE DIFERENTES SUBSTRATOS	33
INTRODUÇÃO	80
OBJETIVO	81
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	81
METODOLOGIA	82
ANÁLISE BROMATOLÓGICA	82
ENSAIOS ENZIMÁTICOS COM SUBSTRATOS SINTÉTICOS.....	82
ENSAIOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NAS BIOMASSAS.....	83
ANÁLISE POR HPLC DAS AMOSTRAS DO ENSAIO DE HIDRÓLISE	83
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	84
RESULTADOS E DISCUSSÕES	85
SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	85
ANÁLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS E MONOSSACARÍDEOS POR HPLC-DIONEX.....	93
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS E BIBLIOGRAFIAS.....	99
CAPÍTULO IV ESTRATÉGIAS UTILIZADAS VISANDO O ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MANANASES DE <i>Clonostachys byssicola</i>	111
INTRODUÇÃO	111
OBJETIVO	112
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	112
MÉTODOS.....	112
PURIFICAÇÃO PARCIAL DE MANANASES.....	112
ELETROFORESE E ZIMOGRÁFIA	114
IDENTIFICAÇÃO DE MANANASES.....	115
EXTRAÇÃO DE RNA.....	119
GEL DE AGAROSE	119
REAÇÃO TRANSCRIPTASE REVERSA	120
DESENHO DOS PRIMERS	120
REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR)	120

PURIFICAÇÃO DOS cDNAs PROVENIENTES DA PCR	121
DIGESTÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO E DO cDNA PURIFICADO	121
PURIFICAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DO RNA	122
ELETOELUIÇÃO	123
RESULTADOS E DISCUSSÕES	124
PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS MANANASES DE <i>Clonostachys byssicola</i>	124
IDENTIFICAÇÃO DE MANANASES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	128
SEQUENCIAMENTO DO TRANSCRITO PREDITO	134
ELETOELUIÇÃO	136
SEQUENCIAMENTO DO RNA TOTAL DE <i>C. byssicola</i> PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MANANASES.....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de enzimas produzidas por diferentes organismos de acordo com os formuladores de produtos enzimáticos (AMFEP).	2
Figura 2. Esquema das principais metodologias realizadas para o estudo de mananases.	19
Figura 3. Configuração da parede celular vegetal. a) Camadas da Parede celular vegetal; b) Componentes lignocelulósicos da parede celular vegetal. Extraído de Sticklen (2000).	33
Figura 4. Classificação dos diferentes tipos de parede celular primária. Extraído de Silva et al (2011b).	34
Figura 5. Ilustração esquemática da estrutura da celulose (Huang, Yao-Bing fu 2013).	35
Figura 6. Estrutura dos principais componentes hemicelulósicos encontrados em plantas. As cadeias hemicelulósicas esquematizadas podem conter em sua estrutura resíduos de glicose, manose, xilose, arabinose e galactose (Obembe et al. 2006).	36
Figura 7. Ilustração esquemática dos principais polissacarídeos pécicos (Canteri et al. 2011).	38
Figura 8. Precursores da lignina. a) Álcool p- coumarílico; b) Álcool coniferílico; c) Álcool sinapílico (Doherty, Mousavioun e Fellows 2011).	40
Figura 9. Modelo de secreção das enzimas celulolíticas por fungos filamentosos (Nevalainen e Peterson 2014).	41
Figura 10. Hidrólise enzimática de manana (Chauhan et al. 2012).	43
Figura 11. Indução de enzimas secretadas por <i>Clonostachys byssicola</i> na condição 1 do pré-tratamento. Anova one way $p=3,005e^{-07}$. Nessa abordagem a casca do grão de soja foi submetido ao pré-tratamento hidrotérmico durante o tempo de 2 horas sob 120 °C em autoclave	54
Figura 12. Indução de enzimas secretadas por <i>Clonostachys byssicola</i> na condição 2 do pré-tratamento. Nessa abordagem A casca de soja moída foi incubada com água destilada em cilindro de aço inoxidável vedável de volume interno de 300 mL na concentração de 1%, temperaturas variáveis (140, 160 e 230 °C) e tempos de incubação de 5 a 30 min. O Licor resultante do pré-tratamento foi utilizado para o crescimento do fungo.	54
Figura 13. Produção de mananases por <i>Clonostachys byssicola</i> cultivado em diferentes meios de cultivo. legenda: M.W (meio mandels & weber); TLE (meio elementos traços); MM (meio mínimo suplementado) Anova one way $p=1,9777e^{-07}$	56
Figura 14. Perfil de holocelulases produzidas por <i>C. byssicola</i> após a etapa de ultrafiltração em membrana com ponto de corte de 30 kDa.	58
Figura 15. Efeito da temperatura na atividade das mananases do extrato bruto concentrado (EBC).	59
Figura 16. Efeito do pH na atividade da mananase do EBC em tampão glicina, fosfato e citrato ($p>0,05$).	60
Figura 17. Efeito de íons metálico e EDTA na atividade da mananases do EBC.	63
Figura 18. Determinação da termoestabilidade das mananases do EBC a 40, 50 e 55 °C.	65
Figura 19. Avaliação da termoestabilidade do EBC na presença do íon cobalto quando incubado na temperatura de 50 °C.	66
Figura 20. Quantificação de açúcares redutores totais por DNS obtidos pela hidrólise da goma de guar, casca de soja, bagaço de cana e goma de alfarroba pelas enzimas do EBC de <i>Clonostachys byssicola</i> nos tempos de 8, 24, 48, 72 e 96h. A: condição 1: sacarificação realizada utilizando 2 mg de proteínas por g de substrato; B condição 2: sacarificação utilizando um volume de enzima por dois volumes de tampão em 1% de substrato. Ambas as hidrólise foram realizadas em tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM) à 40 °C.	85
Figura 21. Quantificação de açúcares redutores totais por DNS obtidos pela hidrólise da goma de guar, casca de soja, bagaço de cana e goma de alfarroba utilizando a enzima comercial (Cellic CTec2-	

nozymes), nos tempos de 8, 24, 48, 72 e 96 horas. A: condição 1: sacarificação realizada utilizando 2 mg de proteínas por g de substrato 1; B condição 2: sacarificação utilizando um volume de enzima por dois volumes de tampão em 1% de substrato. Ambas as hidrólise foram realizadas em tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM) à 40 °C.	88
Figura 22. Perfil enzimático de β - manosidase, β -glicosidade, β - xilosidade e β -galactosidade, utilizando os substratos sintéticos 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG), 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX), 4-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (pNPM) e 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (pNPGal), respectivamente.	90
Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as modificações da estrutura superficial da parede celular, pelas enzimas do extrato bruto concentrado. Legenda: a) bagaço de cana de açúcar sem a atuação de enzimas; b) bagaço de cana de açúcar após a sacarificação enzimática; c) Casca do grão de soja sem a atuação de enzimas; d) casca do grão de soja após a sacarificação enzimática. As setas amarelas indicam a provável camada superficial da casca do grão de soja.....	91
Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as modificações da estrutura das galactomananas, pelas enzimas do extrato bruto concentrado. Legenda: a) goma de alfarroba sem a atuação de enzimas; b) goma de alfarroba após a sacarificação enzimática; c) goma de guar sem a atuação das enzimas; d) goma de guar após a sacarificação enzimática. As setas amarelas indicam o aspecto rugoso das galactomananas.....	92
Figura 25. Identificação de mano-oligossacarídeos produzidos durante a hidrólise do bagaço de cana (A), casca de soja (B); goma de alfarroba (C); goma de guar (D); por enzimas presentes no EBC. Os oligossacarídeos identificados como M2, M3, M4, M5 e M6 são referentes a: manobiose, manotriose, manotetraose, manopentose e manohexaose.....	94
Figura 26. Identificação de celo-oligossacarídeos produzidos durante a hidrólise da goma de alfarrova (A) e goma de guar (B) por enzimas presentes no EBC. Os oligossacarídeos identificados como C2, C3, C4, C5 e C6 são referentes a: celobiose, celotriose, celotetraose, celopentose e celohexaose.....	94
Figura 27. Identificação de xilo-oligossacarídeos produzidos durante a hidrólise do bagaço de cana (A), casca do grão de soja (B); goma de alfarroba (C); goma de guar (D); por enzimas presentes no EBC. Os oligossacarídeos X3, X4 e X6 são referentes a: xilotriose, xilotetraose e xilohexaose, respectivamente.	95
Figura 28. Identificação de monossacarídeos produzidos durante a hidrólise da casca de soja, bagaço de cana, goma de alfarroba e goma de guar. A mostra P3 refere-se à sobreposição do pico de glicose com xilose. Os produtos de hidrólise analisados por HPLC são referentes apenas ao tempo de incubação de 96 H.	96
Figura 29. Estratégias cromatográficas utilizadas na purificação parcial das mananases de <i>Clonostachy byssicola</i> . Na primeira estratégia (A) foram utilizadas duas etapas de cromatografia de troca aniônica forte de tipo Q Sheparose com diferentes tipos de matriz a pH 7. Na estratégia #2, o extrato bruto foi cromatografado em troca aniônica do tipo DEAE utilizando os pH 5 e 7. As duas frações de proteínas com atividade de mananase eluídas em pH 5, foram subsequentemente cromatografadas em trocas aniônica (QXL) e catiônica (SP) no mesmo pH. As frações de proteínas eluídas foram analisadas por atividades enzimáticas, SDS-PAGE e espalhamento dinâmico da luz (DLS).....	113
Figura 30. Esquema do plasmídeo pGAPZ α B.....	122
Figura 31. Perfil cromatográfico do EBC em cromatografia de troca aniônica Q sepharose fast flow. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 0,33 mL/min, coletando frações de 5 mL. Em pH 7,5 utilizando tampão fosfato de sódio.....	125
Figura 32. SDS-PAGE e zimograma (em rosa) do EBC e das frações cromatográficas de QFF fast flow. Abreviações: MM, marcador molecular; EBC, extrato bruto concentrado; QFFP1, fração mananase QFF pico 1; QFFP2, fração mananase QFF pico 2; QFFP3, fração mananase QFF pico 3.	126

- Figura 33.** Perfil cromatográfico da fração QFF-PICO3 em cromatografia de troca aniônica Q sepharose high performance. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 1 ml/min, coletando frações de 1mL..... 127
- Figura 34.** SDS-PAGE da fração cromatográfica QFFG2 em cromatografia de troca aniônica Q sepharose high performance. Abreviações: MM, marcador molecular; QHPP1, fração pico 1; QHP11, fração 11; QHP12, fração 12. 128
- Figure 35.** Predição do peptídeo sinal para endo- β -mananase (BN869_T00006860) realizada por meio da plataforma SignalP 5.0. A linha contínua na cor vermelha (SP/SPI) indica a presença e o tipo de peptídeo sinal identificado; a linha tracejada (CS) na cor verde a sugestão para o sítio de clivagem entre o aminoácido ATA-AV; a linha salmão (OTHER) indica a probabilidade de que a sequência não tenha peptídeo sinal. 130
- Figura 36.** Transcrito predito para endo- β -mananase (BN869_T00006860) identificada a partir da fração semi-purificada por cromatografia (QFF-PICO2). A sequência em vermelho, preto e azul corresponde a sequência do primer desenhada, em que a enzima de restrição PstI (fast digest, termo Scientific) reconhece a região em negrito (identificada pela seta) no sentido 5' e a enzima XbaI reconhece a região em negrito (no sentido 3'); a sequência destacada em laranja corresponde ao peptídeo sinal..... 131
- Figura 37.** Análise da qualidade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%. As duas bandas presentes em destaque referem-se as bandas de RNAs ribossomais (RNAr) 28S e 18S..... 131
- Figura 38.** Figura 38. Gel de agarose 1% mostrando os produtos de amplificação dos cDNAs responsáveis por codificarem mananases obtidas por *C. byssicola*. As setas indicam os diferentes tamanhos do marcador molecular representados em pares de base (pb). A amostra 1 indica o produto de PCR obtido quando utilizada uma temperatura de 59,4 °C na fase de alongamento da PCR. A amostra 2 indica o produto de PCR obtido quando utilizada uma temperatura de 56,5 °C na fase de alongamento da PCR..... 132
- Figure 39.** Gel de agarose 1% mostrando a purificação e digestão do produto do cDNA amplificado. As setas indicam os diferentes tamanhos do marcador molecular representados em pares de base (pb) de mananase. A amostra 1 indica a digestão do transcrito predito; a amostra 2 indica a digestão do vetor de expressão pGAPZ α B. 133
- Figura 40.** Alinhamento múltiplo utilizando a plataforma CLUSTAW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). A sequência identificada como sequenciamento foi fornecida pela macrogen. A sequência BN869_T00006860_1 faz referência a mananase predita por *C. byssicola*. 135
- Figura 41.** Eletroeluição das amostras excisadas do zimograma. A) Gel SDS-PAGE 15 % evidenciando as amostras do extrato bruto concentrado (EBC) e o zimograma destacando as amostras que foram removidas para a eletroeluição. B) Gel SDS-PAGE 15 % demonstrando as amostras eletroeluídas..... 136
- Figura 42.** Gel SDS-PAGE evidenciando as amostras do extrato bruto concentrado (EBC) e o zimograma destacando a degradação do substrato manana 1% (copolimerizado pela manana 1%, carboximetilcelulose 1%, xilana oat spelt 1% e pectina1%) pelas mananases, CMCases, xilanases e pectinases, respectivamente..... 139
- Figura 43.** Cromatografias de troca aniônica em DEAE Shepharose Fast Flow, em tampão fosfato de sódio pH 7 (A) e tampão acetato de sódio pH 5 (B). A composição de proteínas por SDS-PAGE e as atividades enzimáticas das frações eluídas foram analisadas e apresentadas na Figura 44. 146
- Figura 44.** Atividades enzimáticas das frações cromatográficas da troca aniônica em DEAE Shepharose Fast Flow em tampão fosfato de sódio pH 7 (A) e tampão acetado de sódio pH 5 (B). A composição de proteínas por SDS-PAGE 15% das frações de maior absorvância dos picos I (F22) e II (F28) nas condições pH 7(1) e pH 5 (2) são apresentadas à direita da Figura B..... 147
- Figura 45.** Cromatografias de troca aniônica (A) e catiônica (B) em QXL e SP Shepharose Fast Flow da fração DEAE_P1, respectivamente. Em tampão acetato de sódio pH 5. A composição de proteínas

por SDS-PAGE e as atividades enzimáticas das frações eluídas foram analisadas e apresentadas na Figura 46.	149
Figura 46. Atividades enzimáticas das frações cromatográficas de troca catiônica (A) e aniônica (B) em SP e QXL Sheparose Fast Flow, da fração DEAE_P1 respectivamente. As composições das proteínas por SDS-PAGE 15 % das frações de maior absorvância são apresentadas à direita da Figura B.	150
Figura 47. Análise por DLS das frações eluídas da cromatografia de troca catiônica SPFF da fração DEAE_P1. (A) Distribuição de intensidade, volume, e número de moléculas nas triplicatas da fração SPFF_1. (B) Distribuição de intensidade, volume, e número de moléculas nas frações SPFF_2 e SPFF_3. Nas Tabelas anexas são resumidos os diâmetros hidrodinâmicos e as massas moleculares estimadas das partículas.....	151
Figura 48. Análise por DLS das frações eluídas na cromatografia de troca aniônica QXLFF da fração DEAE_P1. Distribuição de intensidade, volume, e número de moléculas na fração QXLFF. Na Tabela anexa são resumidos os diâmetros hidrodinâmicos e as massas moleculares estimadas das partículas.....	152
Figura 49. Cromatografia de troca catiônica (A) e aniônica (B) em SP e QXL Sepharose Fast Flow da fração DEAE_P2, respectivamente, em tampão acetato de sódio pH 5. A composição de proteínas por SDS-PAGE e as atividades enzimáticas das frações eluídas foram analisadas e apresentadas na Figura 50.	154
Figura 50. Atividades enzimáticas das frações cromatográficas de troca catiônica (A) e aniônica (B) em SP e QXL Sepharose Fast Flow, da fração DEAE_P2 respectivamente. A composição de proteínas por SDS-PAGE 15 % das frações de maior absorvância é apresentada à direita da Figura B. Um volume de 15 uL das frações foram utilizadas para a preparação das amostras e a coloração do gel por prata.....	155
Figura 51. Análise por DLS das frações eluídas da cromatografia de troca catiônica e aniônica. Distribuição de intensidade, volume, e número de moléculas da fração F29-33 da SPFF (A) e F34-38 da QXLFF (B). Nas Tabelas anexas são resumidos os diâmetros hidrodinâmicos e as massas moleculares estimadas das partículas.	156
Figura 52. Cromatografias de troca aniônica em DEAE Sheparose Fast Flow. Em tampão citrato de sódio pH 3 (A) e citrato de sódio pH 4 (B). A composição de proteínas por SDS-PAGE e as atividades enzimáticas das frações eluídas foram analisadas e apresentadas na Figura 54 e 53, respectivamente.	158
Figura 53. Atividades enzimáticas das frações cromatográficas de troca aniônica DEAE Sepharose Fast Flow. Em tampão citrato de sódio pH 3 (A) e tampão citrato de sódio pH 4 (B).	159
Figura 54. Composição de proteínas por SDS-PAGE 15 % das frações de maior absorvância das cromatográficas de troca aniônica DEAE Sheparose Fast Flow em tampão citrato de sódio no pH 3 (A) e pH 4 (B). Antes da preparação das amostras e coloração com o gem, uma quantidade de 500 uL das frações foram precipitadas com 500 uL da mistura acetona:metanol (1:1) a -20° C por 1h.	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química da casca do grão de soja.	46
Tabela 2. Composição do meio mínimo suplementado.	49
Tabela 3. Composição do meio Mandels & Weber.	49
Tabela 4. Composição do meio TLE.....	50
Tabela 5. Valores de atividades de mananases obtidos após a ultrafiltração do extrato bruto de <i>C. byssicola</i>	58
Tabela 6. Efeito do pH e temperatura na atividade de mananases descritas para diferentes fungos.....	61
Tabela 7. Efeito de íons e EDTA na atividade de mananases de diversos fungos.....	63
Tabela 8. Efeito de compostos fenólicos na atividade de mananases.	64
Tabela 9. Comparação da composição bromatológica dos diferentes componentes presentes na parede celular da casca do grão de soja.	87
Tabela 10. Identificação de mananases preditas utilizando o banco de dados do uniprot.	137
Tabela 11. Identificação de mananases preditas utilizando o banco de dados de C rosea.	138
Tabela 12. Anotação das prováveis enzimas identificadas em cada família de GHs.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: atividade auxiliar	TLE: meio elemento traços
CBM: módulo de ligação ao carboidrato	M.W: meio Mandels e Weber
DEAE: coluna <i>HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow</i>	EBC: extrato bruto concentrado
QFF: coluna <i>HiTrap Q Sepharose Fast Flow</i>	EC: <i>Enzyme Commission</i>
QHP: coluna <i>Sepharose High Performance</i>	EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
Qxl: coluna <i>Sepharose Fast Flow</i>	GHs: glicosil hidrolases
SPFF: coluna <i>HiTrap SP Sepharose Fast Flow</i>	HPLC: cromatografia líquida de alta performance
CMC: carboximetilcelulose	LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CMCase: carboximetilcelulase	PS: parede secundária
DNS: ácido 3,5-dinitro-salicílico	SDS-PAGE: dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
EBC: extrato bruto concentrado	UI: Unidade Internacioal
CE: carboidrato esterase	pNPG: p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
PLs: polissacarídeos liases	MEV: microscopia eletrônica de varredura
M.M: meio mínimo suplementado	

RESUMO

No Brasil a aplicação da sacarificação enzimática em resíduos agrícolas, como a casca do grão da soja, é uma metodologia cada vez mais empregada, a fim de obter açúcares fermentescíveis que podem ser destinados a diversos processos biotecnológicos. A identificação de grandes porcentagens de componentes hemicelulósicos compondo a parede celular da casca do grão de soja em detrimento dos complexos de lignina; proporcionou a secreção de diferentes enzimas holocelulolíticas pelo fungo filamentosso *Clonostachys byssicola*. Neste contexto, as mananases produzidas por *C. byssicola* foram caracterizadas a fim de identificar as propriedades bioquímicas destas enzimas. Durante a caracterização enzimática, as mananases obtiveram maiores atividades em pH ácido (5,0) e temperatura moderada (50 °C). Além do mais, os estudos dos efeitos de diversos íons e compostos fenólicos ressaltaram que as mananases de *C. byssicola* não dependem de nenhum componente adicional para que haja a ativação enzimática. No entanto, todos os compostos fenólicos utilizados foram capazes de inibir a atividade das mananases. A identificação de diferentes formas de mananases presentes no extrato bruto concentrado mostrou-se significativa para a produção de mano-oligossacarídeos em diferentes fontes de carbonos, constatando que essas enzimas são ferramentas promissoras para a produção de prebióticos (também denominados oligossacarídeos). A análise por HPLC evidenciou que os principais oligossacarídeos detectados durante a degradação dos resíduos lignocelulósicos, como a casca do grão de soja e o bagaço de cana, foram as manotrioses. Em contrapartida, dentre os produtos gerados pela hidrólise de galactomananas (goma de alfarroba e goma de guar) oligossacarídeos de tamanhos diversos tal como manobiose, manotriose, manotetraose, manopentose e manohexaose foram identificados. Diversas tentativas de identificação das mananases de *C. byssicola* por espectrometria de massas utilizando o genoma de *C. rosea*, evidenciou que ambas as espécies apresentam diferenças expressivas nas sequências de cDNAs. Desta maneira o sequenciamento do RNA total de *C. byssicola* foi capaz de identificar diferentes *contings*, caracterizados *in silico*, correspondentes a sequências de mananases, constatando o potencial desse fungo em produzir diferentes tipos de mananases.

Palavras chaves: Mananase, *C. byssicola*, casca de soja

ABSTRACT

In Brazil, the application of enzymatic saccharification in agricultural residues, such as soybean hulls, is an increasingly used methodology in order to obtain fermentable sugars that can be used in various biotechnological processes. The identification of large percentages of hemicellulosic components composing the cell wall of the soybean hull in the detriment of lignin complexes; provided the secretion of different holocellulolytic enzymes by the filamentous fungus *Clonostachys byssicola*. In this context, the mannanases produced by *C. byssicola* were characterized in order to identify the biochemical properties of these enzymes. During enzymatic characterization, mannanases had higher activities at acidic pH (5.0) and moderate temperatures (50 °C). Furthermore, studies of the effects of various ions and phenolic compounds highlighted that *C. byssicola* mannanases do not depend on any additional component for enzymatic activation. However, all the phenolic compounds used were able to inhibit the activity of mannanases. The identification of different forms of mannanases present in the concentrated crude extract proved to be significant for the production of manno oligosaccharides in different carbon sources, noting that these enzymes are promising tools for the production of prebiotics (also called oligosaccharides). The HPLC analysis showed that the main oligosaccharides detected during the degradation of lignocellulosic residues, such as soybean hulls and sugarcane bagasse, were manotrioses. On the other hand, among the products generated by the hydrolysis of galactomannans (locust bean gum and guar gum), oligosaccharides of different sizes such as mannobiose, mannotriose, mannotetraose, manopentose and mannohexaose were identified. Several attempts to identify *C. byssicola* mannanases by mass spectrometry using the genome of *C. rosea*, showed that both species present expressive differences in the cDNA sequences. In this way, the sequencing of the total RNA of *C. byssicola* was able to identify different contigs, characterized in silico, corresponding to mannanase sequences, confirming the potential of this fungus to produce different types of mannanases.

Key words: mannanase, *C. byssicola*, Soybean hulls

CAPÍTULO I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO

A utilização da biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida progressivamente como uma potencial fonte sustentável de polissacarídeos (Himmel et al. 2007). Este reconhecimento é incitado pela possibilidade da transformação da biomassa lignocelulósica em bioprodutos que podem ser utilizados como matérias-primas em outros processos industriais. É nesse contexto que surge o conceito de biorrefinaria da lignocelulose (Silva, Vaz e Ferreira-Filho 2017).

Biorrefinaria é o processamento sustentável da biomassa em um espectro de produtos comercializáveis e energia (Jong e Jungmeier 2015). Neste âmbito, a desconstrução de resíduos agrícolas (biomassa lignocelulósica), captação e metabolização de carboidratos são funções que espécies individuais e comunidades microbianas desempenham e são características de grande interesse para a biorrefinaria (Kamm e Kamm 2004). Atualmente, os principais setores responsáveis por produzirem grandes quantidades de biomassa lignocelulósica residual são: agricultura, silvicultura e indústria (de processos de resíduos e sobras) (Cherubini 2010).

Com relação aos resíduos agrícolas, estes são constituídos, principalmente, por fibras vegetais e podem incluir palha, caule, talo, folhas, cascas, sementes, dentre outros (Mussatto *et al.* 2012). Estes produtos são gerados anualmente em um montante que excede o seu consumo, resultando em um acúmulo no meio ambiente, podendo causar poluição ambiental e efeitos prejudiciais à saúde humana (Sadh, Duhan e Duhan 2018). Contudo, devido à presença de polissacarídeos, proteínas, ligninas e minerais em sua composição estes resíduos passam a ter grande importância biotecnológica (Mussatto et al. 2012).

O emprego de resíduos agrícolas para indução da produção de enzimas por microrganismos é um benefício não só para fins econômicos, devido à redução dos custos das enzimas empregadas na etapa de sacarificação, mas também está inserida dentro de um conceito de biotecnologia branca, que utiliza microrganismos e enzimas para converter os recursos biológicos em produtos industriais com menor dispêndio energético e maior aproveitamento (Silva, Vaz e Ferreira-Filho 2017; Frazzetto 2003).

Dentre os microrganismos utilizados para a decomposição da biomassa

lignocelulósica, os fungos filamentosos têm recebido atenção especial em virtude de sua produção de enzimas. A eficiência na desconstrução da parede celular vegetal é devido à produção de um arsenal enzimático (incluindo celulases, hemicelulases e pectinases) facilitado, geralmente, pelo predomínio de componentes lignocelulósicos em seu biótopo natural (Mäkelä, Donofrio e Vries 2014). Apesar da grande abundância de resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono, sua composição pode variar dependendo da espécie e tecido da planta, estação e localização geográfica. As complexidades estruturais e químicas da biomassa lignocelulósica são fatores que contribuem para o aumento da sua recalcitrância, característica que pode afetar a acessibilidade enzimática. Por esta razão, a inclusão de etapas adicionais, como o pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos é conduzida para reduzir a recalcitrância, por meio da despolimerização e solubilização de alguns componentes da parede celular, e facilitando a sacarificação enzimática (Himmel et al. 2007).

A aplicação de enzimas que degradam a biomassa vegetal no setor industrial tem crescido anualmente. Em 2015, apenas os Membros da Associação de Fabricantes e Formuladores de Produtos Enzimáticos (AMFEP) comercializaram acima de 260 enzimas. Dentre elas, 56% eram enzimas provenientes de fungos filamentosos (Fig. 1), das quais grande parte foi destinada à indústria de alimentos.

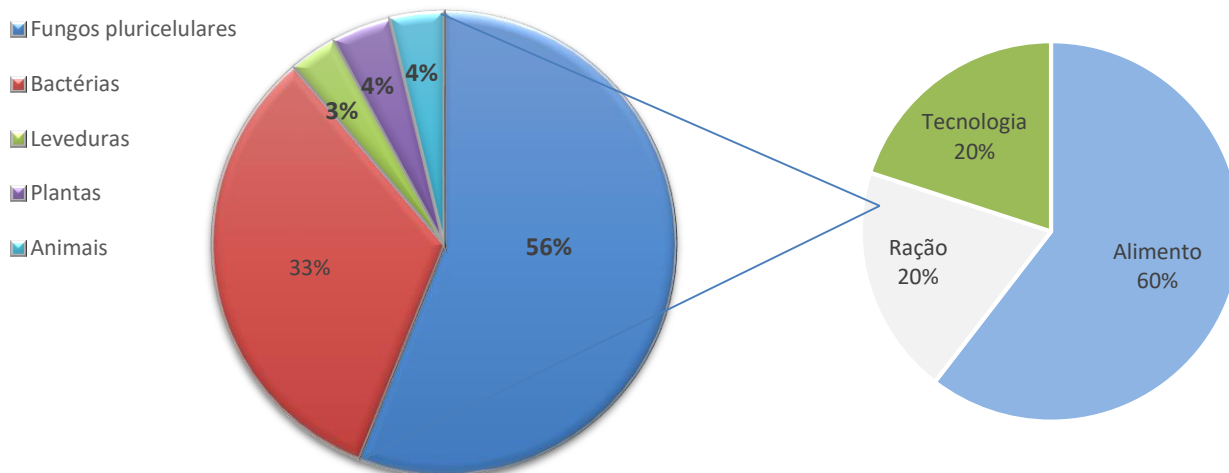



Figura 1. Porcentagem de enzimas produzidas por diferentes organismos de acordo com os formuladores de produtos enzimáticos (AMFEP).

Apesar da maioria das enzimas no portfólio dos membros da AMFEP estarem relacionadas com a indústria de alimentos, existe uma vasta gama de aplicações industriais para diversos tipos de enzimas, incluindo indústria farmacêutica, têxtil, biocombustível, papel e detergente (Ostergaad and Olsen 2011). Com relação às enzimas que degradam componentes hemicelulósicos, as mananases (β -(1,4)-endo-manosidases e β -(1,4)-exo-manosidases) são enzimas envolvidas na degradação da manana. A prospecção dessas enzimas como catalizadores industriais tem resultado no melhoramento de suas propriedades catalíticas e a exploração de enzimas que ainda não foram caracterizadas. Nesse contexto, foi realizada uma revisão de literatura no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology* intitulada *Microbial β -mannosidases and their industrial application* (fator de impacto 4,81) abordando as principais aplicações descritas para essas enzimas no mercado industrial.



Microbial β -mannosidases and their industrial applications

Diandra Albuquerque Lopes Costa¹ · Edivaldo Ximenes Ferreira Filho¹ 

Received: 4 October 2018 / Revised: 30 October 2018 / Accepted: 31 October 2018

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Heteropolymers of mannan are polysaccharide components of the plant cell wall of gymnosperms and some angiosperms, including palm trees (Arecales and Monocot). Degradation of the complex structure of these polysaccharides requires the synergistic action of enzymes that disrupt the internal carbon skeleton of mannan and accessory enzymes that remove side chain substituents. However, complete degradation of these polysaccharides is carried out by an exo-hydrolase termed β -mannosidase. Microbial β -mannosidases belong to families 1, 2, and 5 of glycosyl hydrolases, and catalyze the hydrolysis of non-reducing ends of mannose oligomers. Besides, these enzymes are also involved in transglycosylation reactions. Because of their activity at different temperatures and pH values, these enzymes are used in a variety of industrial applications and the pharmaceutical, food, and biofuel industries.

Keywords β -Mannosidase · Glycosyl hydrolase · Mannan · Polysaccharide · Transglycosylation

Introduction

Plant cell wall is responsible for the maintenance of plant shape and strength, and for protection against microbial attack (York et al. 1986). The cell wall constitutes a large part of the renewable organic matter on Earth and is composed of a complex mixture of polysaccharides (Dhugga et al. 2004). Of these, 40% are cellulose and 25–37% hemicellulose (Pauly and Keegstra 2008; Rinaldi and Schüth 2009). Unlike cellulose, hemicellulose is formed by a linear main chain and may contain side branches composed of sugars other than those found in the main chain. Their composition differs depending on the plant. Gymnosperms contain more heteropolysaccharides of mannan than angiosperms; by contrast, heteropolysaccharides of xylan are predominant in angiosperms, monocot palms, and grasses (Whistler 1993).

Mannan is an essential hemicellulosic component. According to the chemical structure, mannans can be subdivided into pure mannan, glucomannan, galactomannan, and galactoglucomannan (Bremner and Wilkie 1971; Buckeridge et al. 2000a). Mannan polysaccharides are synthesized in the

Golgi complex and subsequently exported to the cell wall via exocytosis (Dhugga et al. 2004). Their primary function is to act as a reserve of carbohydrates in plant endosperm. In plants, these polysaccharides are degraded during seed germination by different classes of functions enzymes, such as β -1,4-D-mannanase (EC 3.2.1.78), β -1,4-D-mannosidase (EC 3.2.1.25), β -D-1,4 glucosidase (EC 3.2.1.21), and α -1,6-D-galactosidase (EC 3.2.1.22). However, β -mannosidases are essential for the generation of the final degradation product, mannose (Buckeridge et al. 2000a; McCleary 1983).

Despite the available knowledge on the functions of these enzymes in higher organisms, production of β -mannosidases by microorganisms is relatively less explored compared to other enzymes, such as cellulases and xylanases. β -Mannosidase-producing microorganisms occur free-living or within the digestive system of some animals (Shallom and Shoham 2003). Among such microbes, β -mannosidases from fungi, belonging to the genus *Aspergillus* (Ascomycota, Trichocomaceae), have been described in most detail (Arai et al. 1995; Do et al. 2009; Zhao et al. 2011). β -Mannosidases are used together with other enzymes in industrial saccharification of hemicellulose for the

conversion of biomass into bioenergy (Ademark et al. 1999), supplementation of animal feed (Odetallah et al. 2002), in the paper industry (Suurnäkki et al. 1997), for pretreatment of lignocellulosic materials (Sun and Cheng 2002), among others. Moreover, their use for the production of mannooligosaccharides has recently generated significant interest in the food ingredients

✉ Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
eximenes@unb.br

¹ Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

 Springer

enzymes in several types of industrial applications, in this review, we aimed to provide an update on the structure of mannan heteropolysaccharides and the properties of β -mannosidases produced by different microorganisms.

Chemical structure of mannan

Based on the chemical structure, mannans are classified into four main groups: pure mannan, glucomannan, galactoglucomannan, and galactomannan. The synthesis of mannan polysaccharides requires the presence of nucleotide sugars as monosaccharide donors, e.g., GDP mannose, GDP glucose, and UDP galactose (Buckeridge 2010). These sugars are used by glycosyltransferases located in the Golgi complex (Pauly et al. 2013). Once assembled by the synthetases, the polysaccharides are secreted, in secretory vesicles, into the intercellular space where the cell wall assembly takes place (Buckeridge 2010). The first mannan synthetase was identified by Dhugga et al. (2004). Subsequently, other proteins involved in the synthesis of these polysaccharides were identified (Gille et al. 2011; Wang et al. 2012; Yin et al. 2011).

Pure mannan is composed of a linear chain containing at least 95% mannose residues, bound by β -1,4-type bonds, and may sporadically contain β -1,6-type bonds and galactose residues (Aspinall 1959). These polysaccharides are found mainly in the seed endosperm of *Phytelephas macrocarpa* monocots (Aspinall et al. 1958) and *Coffea sp.* (Wolfrom et al. 1961), and in the cell wall of some seaweed and plants (Mackie and Sellen 1969). Two types of mannan are found in the seed endosperm of *P. macrocarpa*: mannans A and B, with different molecular size and solubility in aqueous sodium hydroxide (Aspinall et al. 1953). In addition to the reserve carbohydrate function, pure mannan is associated with an embryo protection system against mechanical damage. Because of their high compaction, these polysaccharides confer hardness to seeds accumulating mannan (Buckeridge et al. 2000a). Glucomannans are found mainly in the seed endosperm and tubers of some species of *Iridaceae* monocot and *Liliaceae*. Glucomannan copolymers are composed of mannose and glucose residues and contain β -1,4-type bonds (Meier and Reid 2015; Nishinari et al. 2007). The proportions of mannose and glucose residues vary depending on the plant, with a random distribution. Glucomannans found in *Amorphophallus konjac* tubers have been most extensively investigated, and contain mannose to glucose ratio of 1.6:1. Similarly to some pure mannan structures, chemical structure analysis of *A. konjac* glucomannan revealed the occasional presence of β -1,6-type bonds. Further, these polysaccharides may contain small amounts of acetyl groups, which affect their solubility (Stephen 1983; Sjöström 1993).

Galactoglucomannans were first isolated and characterized in 1958 (Timell 1965) and constitute about 20% of the hemicellulosic component of gymnosperms (Sjöström 1993). Timell (1965) described the isolation of galactoglucomannan from gymnosperms, including the wood of Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis*), Ginkgo biloba (*Picea engelmanni*), and Eastern white cedar (*Tsuga canadenses*). Leaves and stem tissues of some plants contain galactoglucomannans. These polysaccharides are composed of a backbone containing mannose and glucose residues linked by β -1,4-type bonds, and α -1,6-galactose side groups. Acetyl groups at positions C2 and C3 may decorate the structure. Two types of galactoglucomannan are found in gymnosperms. One type contains large amounts of galactose, while the second contains very little galactose, with the ratios of galactose, glucose, and mannose of 1:1:3 and 0.1:1:3, respectively. However, other ratios were also reported (Dey 1978; Sjöström 1993; Timell 1967; Timell 1965).

The solubility in water is influenced by the number of side substituents in the polysaccharide structure, which impede intra- and inter-molecular association (Buckeridge et al. 2000b). Galactomannans are composed of a linear chain of β -1,6-mannose with α -1,6-galactose side groups and makeup 1–38% of the dry weight of seed. In plants, these polysaccharides are found in species from the families *Leguminosae*, *Annonaceae*, *Convolvulaceae*, *Ebenaceae*, *Logoniaceae*, and *Palmae*. However, the most studied are galactomannans found in seed endosperms of different legume species. Other possible locations of these polysaccharides were reported, such as the inner side of the seed coat and the seed hull (e.g., in the leguminous *Gymnocladus dioicus* and *Glycine max*). The proportion of galactose and mannose varies according to the species and method of extraction (Dey 1978).

Induction of microbial β -mannosidase production by agricultural residues

Agro-industrial wastes are generated during the industrial processing of crops. Agro-industrial waste derivatives include different raw materials that can be used as a carbon source for the growth of microorganisms, e.g., straw, stems, leaves, hull, seeds, pulp or stubble, sugarcane bagasse, and of a broad spectrum of agro-industrial side-streams. Large quantities of these wastes are generated worldwide, and their use has a significant economic impact since they constitute low-cost carbon sources for the generation of value-added products (Mussatto et al. 2012).

The conversion of agricultural waste into products with increased aggregate value is a biorefinery approach. Combination of the necessary technologies, raw materials, industrial intermediates, and final products aims to enable the growth of a sustainable economy (Kamm and Kamm 2004). Degradation of agricultural residues and agro-industrial side-streams (lignocellulosic

biomass), uptake, and metabolism of carbohydrates by microorganisms are of importance to the biorefinery concept (Silva et al. 2017).

The use of agricultural residues for the induction of microbial enzyme production benefits not only for the economy but also reduces the environmental impact of waste. Globally prevalent, large quantities of waste are released into the environment without adequate procedures for its elimination. Over 350 million tons of agricultural waste are produced annually (Madurwar et al. 2013). Most of these residues are generated as an outcome of the cultivation of sugarcane, rice, corn, and soybean (Madurwar et al. 2013; Sath et al. 2018).

Majority of studies where agricultural residues are used as the primary source of carbon exploit filamentous fungi as biomass decomposers. Lignocellulolytic enzymes from bacteria have been reported for decades, e.g., from rumen bacteria (Silva et al. 2017). Unlike studies of other enzymes, few studies evaluate the production of β -mannosidase in cultures involving agro-industrial residues. Arai et al. (1995), Kurakake and Komaki (2001), and Prendecka et al. (2007) show that these enzymes are secreted in medium containing wheat bran, 40% (w/v) coffee residue, and 60% (w/v) wheat bran, and 1% (w/v) wheat bran, respectively. In all of these studies, β -mannosidase enzymatic activity was confirmed by incubation with *p*-nitrophenyl B-D-mannopyranoside.

Transcriptional induction of β -mannosidase gene expression

After a microorganism comes in contact with carbon sources composed of mannan heteropolysaccharides, induction of β -mannosidase production is regulated at a transcriptional level.

Ogawa et al. (2012) described in *Aspergillus oryzae* (Ascomycota, Trichocomaceae) the first transcriptional factor responsible for the induction of genes that degrade hemicellulosic components. Named ManR, the factor regulates the expression of β -mannanase, β -mannosidases, and some accessory enzymes. The gene product has a molecular mass of 86.5 kDa and contains two domains, a terminal Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster domain (Pfam 00172) and a fungal-specific transcription factor domain (Pfam04082).

DNA-binding domain of the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster has also been identified in several species of fungi and is responsible for activating the transcription of genes encoding enzymes that are related to carbohydrate metabolism (Ogawa et al. 2012). It was first characterized during studies of the Gl4 protein of *Saccharomyces cerevisiae*, belonging to phylum Ascomycota and order Saccharomycetales (Pan and Coleman 1990). The domain is composed of six cysteine residues that coordinate two zinc ions to form a clover-like structure (Todd and Andrianopoulos 1997).

Studies on the evolutionary relationship between Zn(II)₂Cys₆ proteins revealed that this domain is present in both ascomycetes and basidiomycetes, suggesting that this motif may have arisen before the divergence of the two groups. In addition to the regulation of gene expression, the Zn(II)₂Cys₆ cluster-type binuclear domain has been characterized in proteins related to the use of carbon and nitrogen substrates, production of secondary metabolites, and sexual and asexual development of fungi (Todd and Andrianopoulos 1997).

It is still unclear whether mannobiose can act as an inducer of the Zn(II)₂Cys₆-type transcription factor, but there is strong evidence that this indeed occurs. Ogawa et al. (2012) showed that this disaccharide induces high levels of ManG (β -mannanase) production, indicating that ManR is involved in β -mannosidase production. Because of the lack of knowledge about the mechanism of β -mannosidase induction, further in-depth studies are needed to clarify all components of this process (Chang and Ehrlich 2013).

Just as mannoooligosaccharides induce the production of β -mannosidases, the production of these enzymes is repressed by the presence of easily metabolizable carbon sources, such as mannose, glucose, and fructose (Amore et al. 2013).

Hydrolysis reaction and mechanism of action of β -mannosidases

β -mannan-degrading enzymes can be classified into different glycosyl hydrolase families. Based on the mode of action, can be found two types of enzymes: endohydrolases that cleave glycosidic bonds located inside a molecule and exohydrolases responsible for breaking non-reducing terminal glycosidic bonds (Henrissat and Davies 1997).

The mannan structure requires the synergistic action of a variety of enzymes that deconstruct the main chains and remove side substituents. Enzymes involved in the cleavage of linear mannan are β -mannanases and β -mannosidases. β -Mannanases randomly cleave inner glycosidic bonds of the main mannan chain releasing oligosaccharide products. By contrast, β -mannosidases are exohydrolases responsible for the breakdown of non-reducing terminal regions of mannotriose and mannobiose, with mannose as the final product. β -Glucosidases perform the removal of glucose from glucomannan and galactoglucomannan. Additional enzymes, such as α -galactosidases and acetyl mannan esterases, cleave side chains of galactomannans and release acetyl groups from galactoglucomannan, respectively (Moreira and Filho 2008).

The classification of β -mannosidases is based primarily on the similarity of their sequences. These enzymes can be grouped into families: GH 1, 2, and 5 of glycosyl hydrolases [as specified in the Carbohydrate-Active enZymes, CAZY, database; www.cazy.org]. They can also be classified into

superfamily-nominated clans. Based on the analysis of hydrophobic clusters in protein structure, enzymes in these groups also share tertiary structure similarity. β -Mannosidases are part of clan A of glycosyl hydrolases and possess barrel structure (Henrissat and Bairoch 1996). Kinetic studies revealed that in addition to the catalytic module, β -mannosidases might also possess a non-catalytic site for β -galactomannan binding, recognized as a carbohydrate-binding module (CBM) (Kulminskaya et al. 1999). CBMs are currently grouped into 83 families, according to the CAZy database (last accessed [05, 08, 2018]). One of the significant functions of CBM is to facilitate the association of the enzyme with the substrate, which can increase the catalytic efficiency by prolonging the contact between the two (Herve et al. 2010).

β -Mannosidases catalyze double displacement reactions while retaining carbon anomeric configuration. The catalysis of glycosidic bonds occurs via acid/base reactions in which carboxylic acids from the amino acid side chains of glutamate and aspartate in the active site of the enzyme assume the role of donors (acid) and proton acceptors (base). The distance from the donor and proton acceptor is similar to a hydrogen-bond distance, facilitating the interaction between the substrate and the amino acid side chains (Davies and Henrissat 1995). This mechanism is also called the retention mechanism. First, a carboxylic group acts as an acid and catalyzes the protonation of the glycosidic oxygen. Subsequently, the other carboxylic group acts as a base forming a glycosyl-enzyme intermediate. It is assumed that the transition state between the two reactions is dissociative since the breakdown of the glycosidic bonds occurs before the nucleophilic attack by the base. In the second step of the reaction, the carboxylic group that acted like an acid acts as a base. At this stage, water molecule hydrolyzes the glycosyl-enzyme complex, concomitantly with the transfer of a proton to the base. Enzyme configuration at the end of the reaction is the same as the initial configuration (Brás et al. 2009).

Studies that address enzyme stereochemistry indicate that β -mannosidases use substrates of different conformations. One theoretical consideration of stereoelectronic substrate configurations suggests that in the transition state, the pyranoside ring should exhibit one of four conformations: two classic boat types ($B_{2,5}$ and 2,5B) or two half-chairs (${}^4H^3$ and ${}^3H^4$) (Tailford et al. 2008). These conformations allow several carbons to reach an almost planar geometry required by the enzyme-substrate complex (Rye and Withers 2000). Structural evidence for a transition state similar to boat conformation has been obtained for β -mannosidases from different microorganisms (Tailford et al. 2008). Few studies on β -mannosidase structure are available in the literature. Nascimento et al. (2014) reported that a β -mannosidases from *T. harzianum* displays a typical fold of GH family 2 members, consisting of a centrally positioned catalytic TIM (α/β)8-barrel and four auxiliary, predominantly β -fold, domains.

Transglycosylation reactions catalyzed by β -mannosidases

In addition to hydrolyzing glycosidic bonds, β -mannosidases catalyze transglycosylation reactions (Fig. 1). These enzymes belonging to GH 1 and GH 2 families can transfer mannose residues to other saccharides, producing new oligosaccharides containing β -1,4-type bonds (Li et al. 2015). The double feature of β -mannosidases probably underscores the close evolutionary relationship between glycosyltransferases and glycosyl hydrolases, wherein small molecular adjustments accompanied by pronounced structural alterations favored transglycosylation reactions in enzymes with hydrolytic activity (Bissaro et al. 2015). The nomenclature of these enzymes is analogous to the nomenclature of glycosyl hydrolases, in which the terms transglycosidase and transglycanase refer to exo- and endo-enzymes, respectively (Franková and Fry 2013).

Transglycosylation reactions are carried out by mannosidases from various microbial sources. Referred to as the *cut* and *paste* reaction, the glycosidic bond is first cleaved, and the broken bond energy is conserved by the formation of a new glycosidic bond (Franková and Fry 2013). Depending on the similarity between the donor and acceptor, the reactions are termed homo-transglycosylation or hetero-transglycosylation. In homo-transglycosylation reactions, the donor and acceptor substrate are similar, such as mannobiose (M2) and mannotriose (M3). In this case, β -mannosidases catalyze the transglycosylation of M2 in M3. This is in contrast with hetero-transglycosylation reactions, in which the donor and acceptor substrate is chemically different (Franková and Fry 2013; Zhou et al. 2014). An example of the hetero-transglycosylation reaction was described for β -mannosidase (RmMan5B) from *Rhizomucor miehhei* (Zhou et al. 2014). RmMan5B transferred mannosyl residues to fructose, galactose, sucrose, and laminaribiose.

β -Mannosidases that exhibit both glycosyl hydrolase and glycosyltransferase activities can form an enzyme-substrate complex that can be attacked by an acceptor substrate, different from water, forming a glycosidic bond, rather than releasing a reducing sugar as the hydrolysis product. Because of the dual function of these enzymes, in many cases, high concentrations of the acceptor substrate are required for this reaction to occur, allowing the acceptor substrate to compete with water (Franková and Fry 2013).

Most of the studies that address transglycosylation reactions catalyzed by β -mannosidases use the substrate *p*-nitrophenyl- β -D-mannopyranoside as a simultaneous donor and acceptor. This substrate is highly soluble in water and converted with high efficiency in transglycosylation reactions (Tramice et al. 2009).

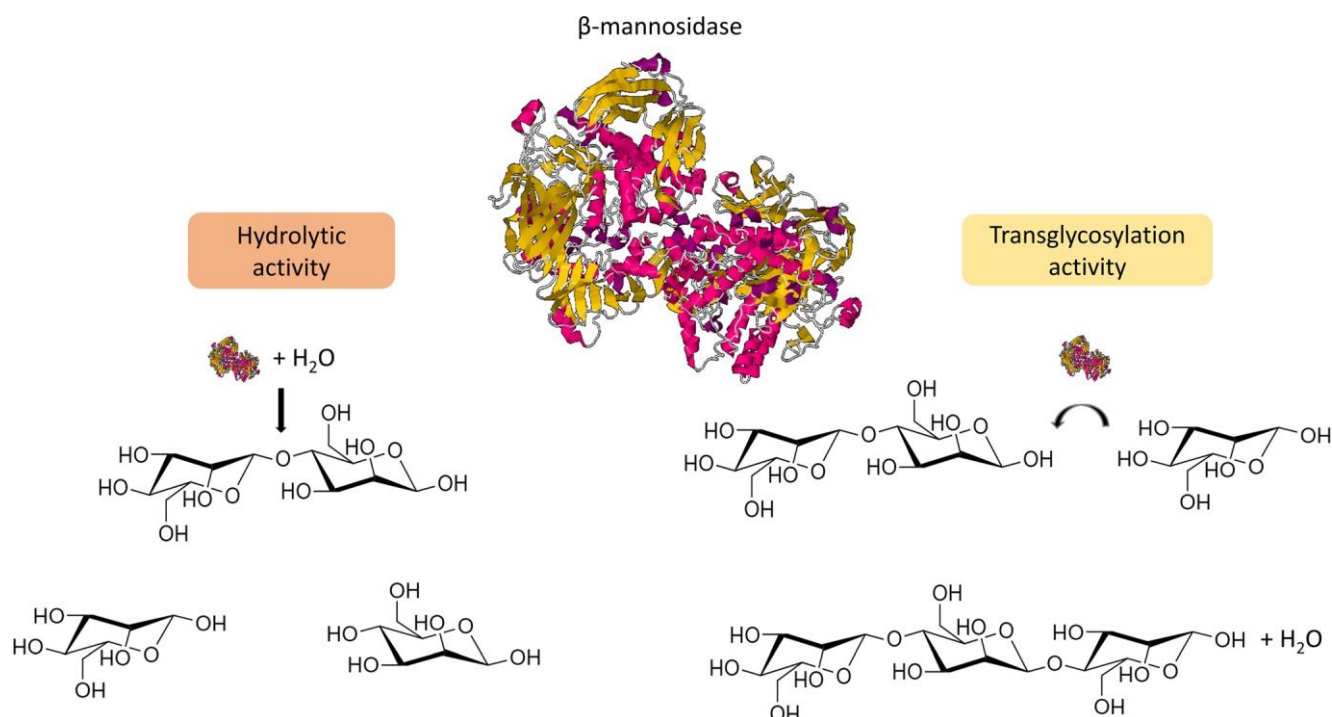


Fig. 1 Dual function of β -mannosidases from microorganisms

Heterologous expression of β -mannosidases

The need to understand the relationships between structure and function of enzymes, to delineate the role of specific amino acid residues, and to make the enzymes suitable for industrial applications led to the increasing use of heterologous expression systems for recombinant production of enzymes because of the low amount of enzymes secreted by wild-type microorganisms (Srivastava and Kapoor 2017). Recombinant enzymes can be expressed in bacteria, yeast, and filamentous fungi. Proteins of prokaryotic microorganisms commonly are recombinantly produced in *E. coli* species and *Bacillus spp.* The choice of this expression system has some advantages including rapid grow and expression, ease culture, and high product yields. Nevertheless, some disadvantages are found in this system like the production of inclusion bodies, disulfide bonds that difficult the expression, production of proteins with endotoxins, and production of unglycosylated proteins (Demain and Vaishnav 2009). Concerning eukaryotic microorganisms, the production of recombinant protein can occur in both yeasts and filamentous fungi. Among the eukaryotic systems, yeast combines the advantages of both prokaryotic and eukaryotic expression systems, with faster growth and inexpensive growth media with the possibility of translational modifications (Gomes et al. 2016). The two most utilized yeast strains are *S. cerevisiae* and *Pichia pastoris* (Saccharomycetales renamed *Komagataella pastoris*) However, the high glycosylation of proteins (realized by *S. cerevisiae*), the presence of codons

bias, and the difficulty of secreting proteins are drawbacks of these microorganisms (Demain and Vaishnav 2009). Lastly, filamentous fungi can produce a high-level secretion of the enzyme in the large scale of production (especially *Aspergillus spp.* and *Trichoderma reesei*), but the complexity and understanding of the physiology of the filamentous fungi is a challenge for the production of heterologous protein (Su et al. 2012). The choice of a suitable expression system for recombinant production of enzyme depends on several factors, such as codon usage, posttranslational modifications, the activity of the protein of interest, and regulation of gene expression (Liu et al. 2013). In addition to improving protein production, strategies for optimized expression include the reduction of the number of proteases secreted by the host microorganism, avoiding losses of the final protein yield (Wang et al. 2005).

Specific codon usage by different organisms is one of the main obstacles that affect the expression of recombinant proteins in microorganisms (Menzella 2011). Since the genetic code is degenerate, the same protein can be encoded by alternative codons. For example, a large number of rare codons present in the native *Thermotoga thermarum* gene, bacteria members of Thermogothae phylum, resulted in the low production of *T. thermarum* β -mannosidase in the heterologous host *Escherichia coli* (Proteobacteria). However, a high amount of β -mannosidase was produced when the rare codons were replaced by host-optimized codons (Shi et al. 2013). Consequently, it is necessary to exchange the rare codons in the target gene without changing the amino acid

sequence of the encoded protein to obtain optimal expression in a heterologous system (Gustafsson et al. 2004).

Concerning posttranslational modifications, glycosylation (binding of oligosaccharides to asparagine, serine, and threonine residues on the surface of the protein molecule) is a necessary feature controlling protein folding (Peberdy 1994). Approximately 50% of secreted eukaryotic enzymes are glycosylated. The presence of glycans may be associated with protection against proteolysis, stability, multiplicity of protein, and also enzymatic activity (Goettig 2016). For this reason, standard fungal and yeast expression systems have been as alternatives to bacterial systems to ensure proper folding and function of produced enzymes (De Pourcq et al. 2010).

Among filamentous fungi that are capable of producing high amounts of proteins, *A. oryzae*, *A. niger* (Ascomycota, Eurotiales), and *Trichoderma sp.* (Ascomycota, Hypocreaceae) have been used as expression platforms for the production of several enzymes, and can produce up to 100 g/L of proteins (Gomes et al. 2016). For instance, *A. oryzae* was reported to produce approximately 270 mg/L of β -mannosidase when the gene was placed under the control of an improved promoter containing a *cis*-regulatory element of region III (Kanamasa et al. 2001). Further, when a plasmid containing 12 copies of *A. oryzae cis* elements of region III was introduced to *A. aculeatus*, the expression of β -mannosidase in the latterly increased 9.4-fold concerning the amount produced in the *A. oryzae* expression system (Kanamasa et al. 2007).

The search for new enzyme production systems has intensified because of the considerable growth of the industrial market for enzymes. Visser et al. (2011) used random mutagenesis (UV-irradiation and treatment with the mutagenic agent *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) to modify the wild-type strain of the fungus *Myceliophthora thermophila* C1 (Ascomycota, Sordariales). The modified fungal strain produced high amounts of cellulase subsequently, gene encoding β -mannosidase was cloned in the same modified C1 strain, resulting in high expression of this enzyme and confirming the efficiency of the developed expression system (Dotsenko et al. 2012).

Few studies explored the use of yeast expression systems for the production of β -mannosidases (Reddy et al. 2013), while numerous studies reported the cloning and expression of these enzymes from bacterial sources, using *E. coli* as the primary expression platform (Table 1) (Bai et al. 2014; Bauer et al. 1996; Dias et al. 2004; Tailford et al. 2007). The use of *E. coli* for heterologous expression of β -mannosidases is probably associated with the rapid growth of the bacterium and, consequently, rapid protein production (Gomes et al. 2016).

Depending on the choice of the expression platform, the culture conditions and the culture medium affect the production and solubility of enzymes. Luria Bertani (LB) broth is a most frequently used medium for the cultivation of bacteria

because it contains many nutrients (Rosano and Ceccarelli 2014). However, the growth of *E. coli* in the LB medium can become limited by the small number of bivalent carbohydrates and cations in the medium (Shi et al. 2013). Regarding the expression of β -mannosidases in eukaryotic organisms, no standard medium is used although a minimal medium has been described for use with a fungal platform (Ademark et al. 2001; Kanamasa et al. 2007). Cultivation characteristics, such as medium state (liquid or solid), incubation time, stirring intensity, pH, temperature, carbon source, and nitrogen availability, impact the production of β -mannosidases (Table 1). Further, cofactors, such as metal ions, and weak detergents, such as Triton or Tween, increase protein solubility by preventing the formation of inclusion bodies (Duan et al. 2015; Wang et al. 2005).

Industrial applications of β -mannosidases

The estimated value global market for enzymes in 2017 was 7082 million, and it is expected to considerably increase in the coming years because of the increasing application of enzymes in the pharmaceutical, food, and detergent industries (<https://www.businesswire.com/news/home/20180628006408/en/Global-Enzymes-Market-Report-2018-Analysis-Type> last accessed [05, 08, 2018]). Currently, 80% of industrially used enzymes are hydrolytic enzymes, mainly those that are involved in the degradation of natural polymers (Qing 2012; Zhao 2012). The use of enzymes that degrade mannose polysaccharides, such as β -mannanases and β -mannosidases, has shown great potential in most industrial sectors. These enzymes may also be used for the hydrolysis of agro-industrial residues for the production of second-generation ethanol (Moreira and Filho 2008). The interest in enzyme systems that degrade mannose polysaccharides has grown annually because of the possible biotechnological application, and wide pH and temperature tolerance (Table 2) (Moreira and Filho 2008).

Pharmaceutical and food ingredient industries

The use of β -mannosidases in conjunction with other enzymes that degrade mannan heteropolysaccharides has received considerable interest in the pharmaceutical and food industries because together, these enzymes produce manno oligosaccharides. These oligomers, acting as prebiotics, may induce specific changes in the composition and activity of the intestinal microbiota (Yamabhai et al. 2016). Because of their indigestibility, these carbohydrates arrive intact in the large intestine and serve as substrates for the intestinal bacteria, supporting the growth of beneficial microorganisms therein (Puupponen-Pimia et al. 2002). In China, the

Table 1 Heterologous expression of β -mannosidases in microbial hosts

Organism	Expression host	Plasmid	Medium	Induction conditions	Reference
Archaea					
<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>E. coli</i> BL21	pET28b	YT	7 h/37 °C	(Park et al. 2011)
Bacteria					
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>E. coli</i> BL21	pET28a	LB	16 h/16 °C	(Tailford et al. 2007)
<i>Cellvibrio mixtus</i>	<i>E. coli</i> BL21	pGEM-T	LB	5 h/37 °C	(Dias et al. 2004)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>E. coli</i> BL21	pET30a	LB	4 h/37 °C	(Bai et al. 2014)
<i>Streptomyces sp. S27</i>	<i>E. coli</i> BL21	pETMan2S27	LB	8 h/30 °C	(Shi et al. 2011)
<i>Thermobifida fusca</i>	<i>E. coli</i> DH5 α F	pUC19	MB	72 h/NR	(Béki et al. 2003)
<i>Thermotoga thermarum</i>	<i>E. coli</i> BL21	NR	NR	5 h/37 °C	(Shi et al. 2013)
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>E. coli</i> BL21	pET28a	LB	12 h/37 °C	(Zhang et al. 2009)
Eukaryota					
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>A. aculeatus</i>	pPL-MN	MM	NR/30 °C	(Kanamasa et al. 2007)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>E. coli</i> DH5 α F	pGEM-7	MM	NR	(Ademark et al. 2001)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia pastoris</i>	pPICZaC-man	BMGY	4 days/28 °C	(Fliedrová et al. 2012)

LB, Luria Bertani broth; MM, minimum medium; MB, basal medium; YT, tryptone-yeast extract; BMGY, buffered glycerol complex medium; NR, not reported

acceptance of manno oligosaccharides as a new food resulted in their consumption of 1.5 g per day in food (Hu et al. 2016). Mannose is the main product of this prebiotics, demonstrating the importance of β -mannosidases, enzymes that produce mannose, for the enhancement of healthy microbiota in human and in animals (Asano et al. 2003; Flemming et al. 2004). When used for medicinal purposes, mannose improves physiological function, reducing or eliminating elevated blood pressure, and is also essential for the treatment of diseases, enhancing the synthesis of immune-stimulating agents, anti-tumor agents, and vitamins. In cell assays of natural cytotoxicity, low concentration of mannose effectively blocks fibrosarcoma (Dengler et al. 2014; Hu et al. 2016). Mannose has been the subject of research not only in the pharmaceutical industry but also in the food and animal feed industries (Sutton and Wilcox 1998; Van Immerseel et al. 2002).

Detergent industry

Biodetergents are composed of a complex combination of enzymes that cleanse and soften fabric (Bettiol et al. 2002). The use of β -mannosidases in the detergent industry has not yet been reported. However, their inclusion could potentially increase stain removal performance, since these enzymes degrade entirely mannan polysaccharides (also known as gums). One of the first gums used by the food industry is guar gum. As it is water-soluble and forms viscous solutions, guar gum is used as a thickener and stabilizer of frozen sauces, ice cream, and desserts (Chudzikowski 1971; Mudgil et al. 2014). Since gums are composed of mannose residues and galactose side

chains, they adhere to cotton fibers causing staining.

A commercial β -mannanase (mannaway) has been included in household detergents (Aehle 2004). This enzyme may be used to diminish stains generated by gums that contain mannan polysaccharides. Nevertheless, the inclusion of β -mannosidases in detergents not only increases stain reduction efficiency but also prevents adsorption of other particles from fabric washing (Bettiol et al. 2002).

Biofuel industry

Ethanol production can be divided into first- and second-generation processing. First-generation ethanol is produced by removing the stock from high-sugar raw materials, such as sugar cane, beet, and corn, followed by its fermentation by yeast. Second-generation ethanol is produced via the conversion of lignocellulosic materials into fermentable sugars by microorganisms. Identified as a renewable energy source, the production of second-generation ethanol facilitates the reduction of areas designated for the production of first-generation ethanol, and the use of raw materials that initially lacked added value (Aditiya et al. 2016; Amore et al. 2014). Lignocellulosic materials used for the production of second-generation ethanol are sugarcane bagasse, sugarcane straw, soybean hulls, corn straw, among others. Because of the complexity of the plant cell wall, several steps are required to obtain sugar monomers from these materials. The first step is the pretreatment, in which the cell wall components become distended; lignin removal may take place at this step. In the second step, after the cell wall recalcitrance is reduced, hydrolytic enzymes produced by

Table 2 Properties of β -mannosidases

Microorganism	Optimum temperature (°C)	Inhibitory ions	Optimum pH	Mass (kDa)	K_m (mM)	V_{max}	Reference
Bacteria							
<i>Aeromonas hydrophila</i>	45	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺ Pb ²⁺	6.0	64	5.1	NR	(Araraki and Kitamikado 1988)
<i>Bacillus sp.</i>	50	Ag ⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺	6.0	94	1.3	NR	(Akino et al. 1988)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	35	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺	7.0	96	0.12	NR	(Bai et al. 2014)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	90	NR	4.75	160	0.44	NR	(Kaper et al. 2002)
<i>Streptomyces sp.</i>	50	Hg ²⁺ , Ag ²⁺ , Fe ²⁺	7.0	92.6	0.01	4.96 μ mol/min/mg	(Shi et al. 2011)
<i>Thermobifida fusca</i>	53	NR	7.17	94	0,18	5.96 μ mol/min/mg	(Béki et al. 2003)
<i>Thermotoga maritima</i>	95	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Ag ²⁺	7.0	96.8	0.49	50.5 U/mg	(Zhang et al. 2009)
<i>Thermotoga neopolitana</i>	87	NR	7.7	100	3.1	36.9 U/mg	(Duffaud et al. 1997)
Eukaryota							
<i>Aspergillus aculeatus</i>	NR ^a	NR	NR	130	NR	NR	(Kanamasa et al. 2007)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	NR	NR	NR	104.21	NR	NR	(Takada et al. 1999)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	70	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺	2.0	130	NR	NR	(Arai et al. 1995)
<i>Aspergillus awamori</i>	70	NR	5	NR	NR	NR	(Kurakake and Komaki 2001)
<i>Aspergillus niger</i>	55	NR	3.5	130	NR	NR	(Bouquelet et al. 1978)
<i>Aspergillus niger</i>	NR	NR	NR	102.33	NR	NR	(Ademark et al. 2001)
<i>Aspergillus niger</i>	NR	NR	3.5–4.0	120	1	NR	(Elbein et al. 1977)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	40	NR	5.3	97	0.4	NR	(Dotsenko et al. 2012)
<i>Phlebia radiata</i>	50	NR	5.5	104.6	0.29	42.46 μ m/min/mg	(Prendecka et al. 2007)
<i>Plebia radiata</i>	50	NR	5.5	89.5	1.78	48.52 μ m/min/mg	(Prendecka et al. 2007)
<i>Plebia radiata</i>	50	NR	5.5	100.3	0.34	38.15 μ m/min/mg	(Prendecka et al. 2007)
<i>Polyporus sulphureus</i>	NR	Ag ⁺ , Fe ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺	2.8	64	1.6	NR	(Wan et al. 1976)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	65	NR	4.5	58	NR	NR	(Gübitz et al. 1996)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	55	NR	2.5	58	NR	NR	(Gübitz et al. 1996)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	76	NR	2.5–3.0	99.9	1.1	61 nKat/mg	(Gomes et al. 2007)
<i>Tremella fuciformis</i>	NR	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺	5.0	140	21	0.6 μ mol/min/mg	(Sone and Misaki 1978)
<i>Trichoderma reesei</i>	NR	Hg ²⁺	3.5	105	0.12	NR	(Kulminskaya et al. 1999)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	40	NR	6.5	114	0.25	91.7 U/mg protein ⁻¹	(Oda and Tonomura 1996)

^a NR, not reported

microorganisms degrade polysaccharides present in the cell wall to their monomer units. The use of enzymatic cocktails containing β -mannosidases is essential for man- nose production in this step. Finally, fermentable sugars generated by the enzymatic cleavage are processed by yeast for the production of second-generation ethanol (Saini et

.2015).

Paper is primarily composed of cellulose fibers. Its production starts with wood fragmentation, followed by two different modes of pulp production: chemical or mechanical. In the plant cell wall, hemicellulose is closely associated with lignin lecules. The extraction of lignin from the cellulose fibers is production of these enzymes.

Paper industry

an essential step for bleaching the cellulose pulps (Moreira and Filho 2008). Pretreatment of wood pulp with enzymes that selectively degrade hemicellulose leads to lignin removal. Thus, β -mannosidases in synergism with other hemicellulosic enzymes have the potential to be used in pulp pretreatment by selectively removing portions of mannan without affecting cellulose structure. Currently, the most commonly used hemicellulosic enzymes are xylanases. However, other hemicellulases, such as β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase, were also shown to efficiently remove hemicellulose from wood (Bajpai 2004; Taylor et al. 2005).

Medicinal use

β -Mannosidase deficiency in animals leads to β -mannosidosis. In goats, this disease is characterized by a lack of enzyme activity in the blood plasma and skin fibroblasts, which leads to the accumulation of a specific oligosaccharide (β -mannosyl-1,4-*N*-acetylglucosamine) in the brain and kidney. This disease is characterized by facial dimorphism, neurological deficits, accumulations of lysosomal vacuoles in all cell types, and demyelination of the central nervous system. Without intervention, animals with this disease die within the first two years of life. Animals that manifest this disease are homozygous recessive, with the same probability of manifestation of the disease in both sexes, since the disease is autosomal recessive (Johnson 2014; Jones et al. 1984). The use of heterologous β -mannosidases in mannosidosis treatment has received considerable attention mainly because of progress in their production using microbial expression platforms. These enzymes are tagged with receptors that allow their insertion in the lysosomes, in which the oligosaccharides are degraded (Fogh et al. 2003).

Conclusions

The double function of β -mannosidases is reflected in their extensive use in diverse industrial applications, in both the hydrolysis of hemicellulosic polysaccharides and the synthesis of oligosaccharides. In the biotechnology context, the use of β -mannosidases for production of mannan-oligosaccharides has been received great attention, especially in medical use to the growth of beneficial microorganisms in gut microbiota. However, due to small amounts of these enzymes produced by microorganisms, the use of heterologous expression systems has been a significant challenge for academic research. β -Mannosidase structure and transcriptional regulation are not yet entirely complete, and further intense studies are needed to fill the gaps that impede high yielding heterologous

Funding information The authors acknowledge the receipt of financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Foundation for Research Support of the Federal District (FAPDF).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest. **Ethical statement** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Ademark P, Lundqvist J, Högglund P, Tenkanen M, Torto N, Tjerneld F, Stålbrand H (1999) Hydrolytic properties of a beta-mannosidase purified from *Aspergillus niger*. *J Biotechnol* 75:281–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00172-8)
- Ademark P, De Vries RP, Högglund P, Stålbrand H, Visser J (2001) Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an alpha-galactosidase and a beta-mannosidase involved in galactomannan degradation. *Eur J Biochem* 268:2982–2990. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02188.x>
- Aditiya HB, Mahlia TMI, Chong WT, Nur H, Sebayang AH (2016) Second generation bioethanol production: a critical review. *Renew Sust Energ Rev* 66:631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Aehle W (2004) *Enzymes in industry*. Wiley-VCH, Weinheim
- Akino T, Nakamura N, Horikoshi K (1988) Characterization of β -mannosidase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric Biol Chem* 52:1459–1464. <https://doi.org/10.1080/00021369.1988.10868864>
- Amore A, Giacobbe S, Faraco V (2013) Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Curr Genomics* 14:230–249. <https://doi.org/10.2174/1389202911314040002>
- Amore A, Giacobbe S, Liguori R, Faraco V (2014) The second generation ethanol production. *Rend Accad Naz Sci XL Mem Sci Fis Naur* 37:113–136. <https://doi.org/10.4399/97888548717176>
- Arai M, Fujimoto H, Ooi T, Ogura S, Murao S (1995) Purification and properties of a β -mannosidase from *Aspergillus aculeatus*. *J Appl Glycosci* 42:49–51. <https://doi.org/10.11541/jag1994.42.49>
- Araraki M, Kitamikado T (1988) Exo-1,4-beta-mannanase from *Aeromonas hydrophila*. *Methods Enzymol* 160:583–589. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60172-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60172-8)
- Asano I, Hamaguchi K, Fujii S, Iino K (2003) In vitro digestibility and fermentation of manno-oligosaccharides from coffee mannan. *Food Sci Technol Res* 9:62–66. <https://doi.org/10.3136/fstr.9.62>
- Aspinall GO (1959) Structural chemistry of the hemicelluloses. In: Wolf from ML (ed) *Advances in carbohydrate chemistry*, 1st edn. Academic Press, New York, pp 429–526
- Aspinall GO, Hirst EL, Percival EGV, Williamson IR (1953) The mannans of ivory nut (*Phytalephas macrocarpa*). Part I. The methylation of mannan A and mannan B. *J Chem Soc* 0:3184–3188. <https://doi.org/10.1039/JR9530003184>
- Aspinall GO, Rashbrook RB, Kessler G (1958) The Mannans of ivory nut (*Phytalephas macrocarpa*). Part II. The partial acid hydrolysis of mannan A and B. *J Chem Soc*. <https://doi.org/10.1039/JR9580000215>
- Bai X, Hu H, Chen H, Wei Q, Yang Q, Huang Q (2014) Expression of a β -mannosidase from *Paenibacillus polymyxa* A-8 in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *PLoS One* 9: e111622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111622>

- Bajpai P (2004) Biological bleaching of chemical pulps. *Crit Rev Biotechnol* 24:1–58. <https://doi.org/10.1080/07388550490465817>
- Bauer MW, Bylina EJ, Swanson RV, Kelly RM (1996) Comparison of a β -glucosidase and a β -mannosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 271:23749–23755. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.39.23749>
- Béki E, Nagy I, Vanderleyden J, Jäger S, Kiss L, Fülöp L, Hornok L, Kukolya J (2003) Cloning and heterologous expression of a β -D-mannosidase (EC 3.2.1.25)-encoding gene from *Thermobifida fusca* TM51. *Appl Environ Microbiol* 69:1944–1952. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1944-1952.2003>
- Bettli JLP, Cooremans SPG, Johnstone KR, Sreekrishna K, Saunders CW, Herbots IVAJ, Baeck AC (2002) Laundry detergent compositions comprising a saccharide gum degrading enzyme. Procter & Gamble. N° US 6.486.112 B1. Cincinnati
- Bissaro B, Monsan P, Fauré R, O'Donohue MJ (2015) Glycosynthesis in a waterworld: new insight into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycoside hydrolases. *Biochem J* 467:17–35. <https://doi.org/10.1042/BJ20141412>
- Bouquelet S, Spik G, Montreuil J (1978) Properties of a β -D-mannosidase from *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta* 522:521–530. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(78\)90084-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(78)90084-0)
- Brás NF, Fernandes PA, Ramos MJ (2009) Docking and molecular dynamics studies on the stereoselectivity in the enzymatic synthesis of carbohydrates. *Theor Chem Accounts* 122:283–296. <https://doi.org/10.1007/s00214-009-0507-2>
- Bremner I, Wilkie KCB (1971) The hemicelluloses of bracken: Part II. A galactoglucomannan. *Carbohydr Res* 20:193–203. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81372-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81372-5)
- Buckeridge MS (2010) Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiol* 154:1017–1023. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>
- Buckeridge MS, Pessoa dos Santos H, Tiné MAS (2000a) Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem* 38:141–156. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00162-5](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00162-5)
- Buckeridge MS, Tiné MAS, dos Santos HP, Lima DU (2000b) Cell wall storage polysaccharides in seeds. Structure, metabolism, function and ecological aspects. *Rev Bras Fisiol Veg* 12:137–162
- Chang PK, Ehrlich KC (2013) Genome-wide analysis of the Zn(II)2Cys6 zinc cluster-encoding gene family in *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4289–4300. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4865-2>
- Chudzikowski RJ (1971) Guar gum and its applications. *J Soc Cosmet Chem* 22:43–60
- Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3:853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- De Pourcq K, De Schutter K, Callewaert N (2010) Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:1617–1631. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2721-1>
- Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27:297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Dengler EC, Alberti LA, Bowman BN, Kerwin AA, Wilkerson JL, Moezzi DR, Limanovich E, Wallace JA, Milligan ED (2014) Improvement of spinal non-viral IL-10 gene delivery by D-mannose as a transgene adjuvant to control chronic neuropathic pain. *J Neuro-Oncol* 11:92. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-92>
- Dey PM (1978) Biochemistry of plant galactomannans. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 35:341–376. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60221-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60221-8)
- Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P (2004) Guar seed beta-mannan synthase is a member of the cellulose synthase super gene family. *Science* 303:363–366. <https://doi.org/10.1126/science.1090908>
- Dias FM, Vincent F, Pell G, Prates JA, Centeno MS, Tailford LE, Ferreira LM, Fontes CM, Davies GJ, Gilbert HJ (2004) Insights into the molecular determinants of substrate specificity in glycoside hydrolase family 5 revealed by the crystal structure and kinetics of *Cellvibrio mixtus* mannosidase 5A. *J Biol Chem* 279:25517–25526. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401647200>
- Do BC, Dang TT, Berrin JG, Haltrich D, To KA, Sigillot JC, Yamabhai M (2009) Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb Cell Factories* 8:59. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-59>
- Dotsenko GS, Semenova MV, Sinitsyna OA, Hinz SW, Wery J, Zorov IN, Kondratieva EG, Sinitsyn AP (2012) Cloning, purification, and characterization of galactomannan-degrading enzymes from *Myceliophthora thermophila*. *Biochemistry (Mosc)* 77:1303–1311. <https://doi.org/10.1134/S0006297912110090>
- Duan X, Zou C, Wu J (2015) Triton X-100 enhances the solubility and secretion ratio of aggregation-prone pullulanase produced in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol* 194:137–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.024>
- Duffaud GU, McCutchen CM, Leduc P, Parker KN, Kelly RM (1997) Purification and characterization of extremely thermostable beta-mannanase, beta-mannosidase, and alpha-galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. *Appl Environ Microbiol* 63:169–177
- Elbein AD, Adya S, Lee YC (1977) Purification and properties of a beta-mannosidase from *Aspergillus niger*. *J Biol Chem* 252:2026–2031
- Flemming JS, Freitas JRS, Fontoura P, Montanhini Neto R, Arruda JS (2004) Use of mannanoligosaccharides in broiler feeding. *Rev Bras Cienc Avic* 6:159–161. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2004000300005>
- Fliedrová B, Gerstorferová D, Křen K, Weignerová L (2012) Production of *Aspergillus niger* β -mannosidase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 85:159–164. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.07.012>
- Fogh J, Irani M, Andersson C, Weigelt C (2003) Production of recombinant human lysosomal alpha-mannosidase. *HemeBiotech*. N° US2003/0199073. Hillerod
- Franková L, Fry SC (2013) Biochemistry and physiological roles of enzymes that cut and paste plant cell-wall polysaccharides. *J Exp Bot* 64:3519–3550. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert201>
- Gille S, Cheng K, Skinner ME, Liepman AH, Wilkerson CG, Pauly M (2011) Deep sequencing of woodoo lily (*Amorphophallus konjac*): an approach to identify relevant genes involved in the synthesis of the hemicellulose glucomannan. *Planta* 234:515–526. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1422-z>
- Goettig P (2016) Effects of glycosylation on the enzymatic activity and mechanisms of proteases. *Int J Mol Sci* 17:1969. <https://doi.org/10.3390/ijms17121969>
- Gomes J, Terler K, Kratzer R, Kainz E, Steiner W (2007) Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: isolation, partial purification and characterization of the enzyme. *Enzym Microb Technol* 40:969–975. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.011>
- Gomes AR, Byregowda SM, Veeregowda BM, Balamurugan V (2016) An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Adv Anim Vet Sci* 4:346–356. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>
- Gübitz GM, Hayn M, Sommerauer M, Steiner W (1996) Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*: characterisation and synergism of two endo β -mannanases and a β -mannosidase. *Bioresour Technol* 58:127–135. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00093-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00093-4)

- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22:346–353. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>
- Henrissat B, Bairoch A (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316:695–696. <https://doi.org/10.1042/bj3160695>
- Henrissat B, Davies G (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 7:637–644. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80072-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80072-3)
- Herve C, Rogowski A, Blake AW, Marcus SE, Gilbert HJ, Knox JP (2010) Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15293–15298. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005732107>
- Hu X, Shi Y, Zhang P, Miao M, Zhang T, Jiang B (2016) D-mannose: properties, production, and applications: an overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 15:773–785. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12211>
- Johnson WG (2014) Disorders of glycoprotein degradation: sialidosis, fucosidosis, α -mannosidosis, β -mannosidosis, and aspartylglycosaminuria. In: Rosenberg RN, Pascual JM (eds) *Rosenberg's molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease*, 5th edn. Academic Press, Amsterdam, pp 369–383
- Jones MZ, Rathke EJS, Cavanagh K, Hancock LW (1984) Beta-mannosidosis: prenatal biochemical and morphological characteristics. *J Inher Metab Dis* 7:80–85. <https://doi.org/10.1007/BF01805811>
- Kamm B, Kamm M (2004) Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:137–145. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7>
- Kanamasa S, Takada G, Kawaguchi T, Sumitani J, Arai M (2001) Overexpression and purification of *Aspergillus aculeatus* beta-mannosidase and analysis of the integrated gene in *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng* 92:131–137. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80213-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80213-9)
- Kanamasa S, Kawaguchi T, Takada G, Kajiwara S, Sumitani J, Arai M (2007) Development of an efficient production method for β -mannosidase by the creation of an overexpression system in *Aspergillus aculeatus*. *Lett Appl Microbiol* 45:142–147. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02160.x>
- Kaper T, van Heusden HH, van Loo B, Vasella A, van der Oost J, de Vos WM (2002) Substrate specificity engineering of beta-mannosidase and beta-glucosidase from *Pyrococcus* by exchange of unique active site residues. *Biochemistry* 41:4147–4155. <https://doi.org/10.1021/bi011935a>
- Kulminkaya AA, Eneiskaya EV, Isaeva-Ivanova LS, Savel'ev AN, Sidorenko IA, Shabalin KA, Golubev AM, Neustroev KN (1999) Enzymatic activity and β -galactomannan binding property of β -mannosidase from *Trichoderma reesei*. *Enzym Microb Technol* 25:372–377
- Kurakake M, Komaki T (2001) Production of beta-mannanase and beta-mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties. *Curr Microbiol* 42:377 – 380. <https://doi.org/10.1007/s002840010233>
- Li YX, Liu Y, Yan QJ, Yang SQ, Jiang ZQ (2015) Characterization of a novel glycoside hydrolase family 5 β -mannosidase from *Absidia corymbifera* with high transglycosylation activity. *J Mol Catal B Enzym* 122:265–274. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.018>
- Liu L, Yang H, Shin HD, Chen RR, Li J, Du G, Chen J (2013) How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered* 4:212–223. <https://doi.org/10.4161/bioe.24761>
- Mackie W, Sellen DB (1969) The degree of polymerization and polydispersity of mannan from the cell wall of the green seaweed *Codium fragile*. *Polymer* 10:621–632. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(69\)90082-2](https://doi.org/10.1016/0032-3861(69)90082-2)
- Madurwar MV, Ralegaonkar RV, Mandavgane SA (2013) Application of agro-waste for sustainable construction materials: a review. *Constr Build Mater* 38:872–878. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.09.011>
- McCleary BV (1983) Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannanase. *Phytochemistry* 22:649–658. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86956-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86956-3)
- Meier H, Reid JSG (2015) Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: Pirson A, Zimmermann MH (eds) *Encyclopedia of plant physiology*, 1st edn. Springer, Berlin, pp 418–461
- Menzella HG (2011) Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories* 10:15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-15>
- Moreira LRS, Filho EXF (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:165–178. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1423-4>
- Mudgil D, Barak S, Khatkar BS (2014) Guar gum: processing, properties, and food applications - a review. *J Food Sci Technol* 51:409–418. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0522-x>
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012) Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. In: Show KY (ed) *Industrial Waste*, 1st edn. InTech, Rijeka, pp 121–140
- Nascimento AS, Muniz JRC, Aparício R, Golubev AM, Polikarpov I (2014) Insights into the structure and function of fungal β -mannosidases from glycoside hydrolase family 2 based on multiple crystal structures of the *Trichoderma harzianum* enzyme. *FEBS J* 281:4165–4178
- Nishinari K, Takemasa M, Zhang H, Takahashi R (2007) Storage plant polysaccharides: xyloglucans, galactomannans, glucomannans. In: Kamerling JP (ed) *Comprehensive glycoscience*, 1st edn. Elsevier, New York, pp 613–646
- Oda Y, Tonomura K (1996) Characterization of β -mannanase and β -mannosidase secreted from the yeast *Trichosporon cutaneum* JCM 2947. *Lett Appl Microbiol* 22:173–178. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01136.x>
- Odetallah NH, Ferket PR, McNaughton JL (2002) Effect of mannan-endo-1,4-beta-mannosidase on the growth performance of turkeys fed diets containing 44 and 48% crude protein soybean meal. *Poult Sci* 81:1322–1331. <https://doi.org/10.1093/ps/81.9.1322>
- Ogawa M, Kobayashi T, Koyama Y (2012) ManR, a novel Zn(II)₂Cys₆ transcriptional activator, controls the β -mannan utilization system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* 49:987–995. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.006>
- Pan T, Coleman JE (1990) GAL4 transcription factor is not a Bzinc finger[^] but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc Natl Acad Sci* 87:2077–2081
- Park SH, Park KH, Oh BC, Alli I, Lee BH (2011) Expression and characterization of an extremely thermostable β -glycosidase (mannosidase) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* DSM3638. *New Biotechnol* 28:639–648. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.05.002>
- Pauly M, Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J* 54:559–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x>
- Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238:627–642. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>
- Peberdy JF (1994) Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. *Trends Biotechnol* 12:50–57. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90100-7)
- Predecka M, Buczyńska A, Rogalski J (2007) Purification and characterization of β -mannosidases from white rot fungus *Phlebia radiata*. *Pol J Microbiol* 56:139–147

- Puupponen-Pimia R, Aura A-M, Oksman-Caldentey K-M, Mylläriner P, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Poutanen K (2002) Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci Technol* 13: 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00020-1)
- Qing Z (2012) The application of enzyme and yeast. Thesis, Saimaa University of Applied Sciences
- Rahmani N, Kashiwagi N, Lee J, Niimi-Nakamura S, Matsumoto H, Kahar P, Lisdiyanti P, Yopi PB, Ogino C, Kondo A (2017) Mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Kitasatospora* sp. isolated in Indonesia and its potential for production of mannooligosaccharides from mannan polymers. *AMB Express* 7: 100. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0401-6>
- Reddy SK, Rosengren A, Klaubauf S, Kulkarni T, Karlsson EN, de Vries RP, Ståhlbrand H (2013) Phylogenetic analysis and substrate specificity of GH2 β -mannosidases from *Aspergillus* species. *FEBS Lett* 587:3444–3449. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.029>
- Rinaldi R, Schüth F (2009) Design of solid catalysts for the conversion of biomass. *Energy Environ Sci* 2:610–626. <https://doi.org/10.1039/B902668A>
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rye CS, Withers SG (2000) Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4:573–580. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00135-6)
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour Bioprocess* 5:1. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Saini JK, Saini R, Tewari L (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* 5:337–353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219–228. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)
- Shi P, Yao G, Cao Y, Yang P, Yuan T, Huang H, Bai Y, Yao B (2011) Cloning and characterization of a new β -mannosidase from *Streptomyces* sp. S27. *Enzym Microb Technol* 49:277–283. <https://doi.org/10.1016/j.enzymtec.2011.06.003>
- Shi H, Huang Y, Zhang Y, Li W, Li X, Wang F (2013) High-level expression of a novel thermostable and mannose-tolerant β -mannosidase from *Thermotoga thermarum* DSM 5069 in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 13:83. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-83>
- Silva COG, Vaz RP, Filho EXF (2017) Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels* Bioprod Biorefin 12:277–289. <https://doi.org/10.1002/bbb.1832>
- Sjöström E (1993) Wood polysaccharides. In: Sjöström E (ed) *Wood chemistry, fundamentals, and applications*, 2nd edn. Academic Press, San Diego, pp 51–70
- Sone Y, Misaki A (1978) Purification and characterization of beta-D-mannosidase and beta-N-acetyl-D-hexosaminidase of *Tremella fuciformis*. *J Biochem* 83:1135–1144. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132003>
- Srivastava PK, Kapoor M (2017) Production, properties, and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnol Adv* 35:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.001>
- Stephen AM (1983) Other plant polysaccharides. In: Aspinall GO (ed) *The polysaccharides*, 1st edn. Academic Press, New York, pp 97–180
- Su X, Schmitz G, Zhang M, Mackie RI, Cann IKO (2012) Heterologous gene expression in filamentous fungi. In: Sariaslani S, Gadd GM (eds) *Advances in applied microbiology*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, pp 2–44
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83:11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Sutton RL, Wilcox J (1998) Recrystallization in ice cream as affected by stabilizers. *J Food Sci* 63:104–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15686.x>
- Suurnäkki A, Tenkanen M, Buchert J, Viikari L (1997) Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. In: Scheper T (ed) *Biotechnology in the pulp and paper industry*, 1st edn. Springer, Berlin, pp 261–287
- Tailford LE, Money VA, Smith NL, Dumon C, Davies GJ, Gilbert HJ (2007) Mannose foraging by *Bacteroides thetaiotaomicron*: structure and specificity of the β -mannosidase, BtMan2A. *J Biol Chem* 282:11291–11299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610964200>
- Tailford LE, Offen WA, Smith NL, Dumon C, Morland C, Gratien J, Heck MP, Stick RV, Blériot Y, Vasella A, Gilbert HJ, Davies GJ (2008) Structural and biochemical evidence for a boat-like transition state in β -mannosidases. *Nat Chem Biol* 4:306–312. <https://doi.org/10.1038/nchembio.81>
- Takada G, Kawaguchi T, Kaga T, Sumitani J, Arai M (1999) Cloning and sequencing of β -mannosidase gene from *Aspergillus aculeatus* no. F-50. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:206–209. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.206>
- Taylor JL, Jaquess PA, Lund H, Pedersen H, Xu H, Clemmons J (2005) Use of hemicellulase composition in mechanical pulp production. *Novozymes N° US 2005/0000666 A1*. Buckman Laboratories International, New York
- Timell TE (1965) Wood hemicelluloses: part II. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 20:409–483. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60304-5](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60304-5)
- Timell TE (1967) Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci Technol* 1:45–70. <https://doi.org/10.1007/BF00592255>
- Todd RB, Andrianopoulos A (1997) Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* 21:388–405. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.0993>
- Tramice A, Andreotti G, Giordano A, Trincone A (2009) Enzymatic transglycosylation. In: Flickinger MC (ed) *Encyclopedia of industrial biotechnology*, 1st edn. Wiley, Hoboken, pp 1–15
- Van Immerseel F, Cauwerts K, Devriese LA, Haesebrouck F, Ducatelle R (2002) Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *Worlds Poult Sci J* 58:501–513. <https://doi.org/10.1079/WPS20020036>
- Visser H, Joosten V, Punt PJ, Gusakov AV, Olson PT, Joosten R, Bartels J, Visser J, Sinitsyn AP, Emalfarb MA, Verdoes JC, Wery J (2011) Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chryso sporium lucknowense* C1. *Ind Biotechnol* 7:214–224. <https://doi.org/10.1089/ind.2011.7.214>
- Wan CC, Muldrey JE, Li SC, Li TH (1976) β -Mannosidase from the mushroom *Poly porus sulfureus*. *J Biol Chem* 251:4384–4388
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol Adv* 23:115–129. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.11.001>
- Wang Y, Alonso AP, Wilkerson CG, Keegstra K (2012) Deep EST profiling of developing fenugreek endosperm to investigate galactomannan biosynthesis and its regulation. *Plant Mol Biol* 79:243–258. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9909-y>
- Whistler RL (1993) Hemicelluloses. In: Whistler RL, BeMiller JN (eds) *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, pp 295–308
- Wolfrom M, Laver ML, Patin DL (1961) Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and characterization of a mannan. *J Org Chem* 26:4533–4535. <https://doi.org/10.1021/jo01069a080>
- Yamabhai M, Sak-Ubol S, Srila W, Haltrich D (2016) Mannan biotechnology from biofuels to health. *Crit Rev Biotechnol* 36:32–42. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923372>
- Yin L, Verhertbruggen Y, Oikawa A, Manisseri C, Knierim B, Prak L, Jensen JK, Knox JP, Auer M, Willats WG, Scheller HV (2011) The

- operative activities of CSLD2, CSLD3, and CSLD5 are required for normal arabidopsis development. *Mol Plant* 4:1024–1037 <https://doi.org/10.1093/mp/ssr026>
- York WS, Darvill AG, McNeil M, Stevenson TT, Albersheim P (1986) Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol* 118:3–40. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18062-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18062-1)
- Zhang M, Jiang Z, Li L, Katrolia P (2009) Biochemical characterization of a recombinant thermostable β -mannosidase from *Thermotoga maritima* with transglycosidase activity. *J Mol Catal B Enzym* 60: 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.04.005>
- Zhao Q (2012) The application of enzyme and yeast. Thesis, Saimaa University of Applied Sciences
- Zhao W, Zheng J, Zhou HB (2011) A thermotolerant and cold-active mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*. *Bioresour Technol* 102:7538–7547. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.070>
- Zhou P, Liu Y, Yan Q, Chen Z, Qin Z, Jiang Z (2014) Structural insights into the substrate specificity and transglycosylation activity of a fungal glycoside hydrolase family 5 β -mannosidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70:2970–2982. <https://doi.org/10.1107/S1399004714019762>

OBJETIVO

O objetivo geral da tese foi investigar o potencial de mananases produzidas por *Clonostachys byssicola* como ferramentas promissoras em processos de biorrefinaria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar bioquimicamente as mananases presentes no extrato bruto concentrado de *C. byssicola* cultivado em casca do grão de soja para revelar suas potencialidades biotecnológicas;
- Avaliar o potencial do extrato bruto concentrado de *C. byssicola* na sacarificação da casca do grão da soja, do bagaço de cana, da goma de alfarroba e da goma de guar;
- Isolar e identificar as diferentes mananases expressas por *C. byssicola*.

JUSTIFICATIVA

A diversidade da biomassa vegetal brasileira mostra a propensão natural que o Brasil tem para agricultura e a atividade agroindustrial. No entanto, ainda que alguns resíduos agrícolas já contribuam de forma significativa para a economia do país, muitas matérias primas ainda são subaproveitadas, como a casca do grão de soja que vem anualmente aumentando de forma significativa. O grande consumo de soja no Brasil e o aumento na sua exportação contribuíram para que o Brasil alcançasse a posição de maior produtor mundial, e desta forma o acúmulo dos resíduos da soja podem gerar danos ambientais. À vista disso, a destinação destes resíduos em rotas de biorrefinaria é uma maneira de agregar valor aos resíduos agrícolas.

O potencial de fungos filamentosos na produção de enzimas tem sido explorado ao longo dos anos, somado a necessidade de se estudar novas cepas para a produção de enzimas é uma forma de melhorar a combinação de enzimas necessárias para degradação de componentes lignocelulósicos, como também evidenciar os principais tipos de enzimas produzidas por um determinado microrganismo. Embora poucos estudos têm sido executados com o objetivo de avaliar o potencial de *C. byssicola* na produção de

enzimas que degradam a manana, a comercialização de formuladores com a atividade biológica contra fungos fitopatogênicos produzidas a partir de *C. rosea*, tem incentivado os estudos de diferentes espécies de *Clonostachys*. Análises de bioinformática têm revelado que grandes quantidades de glicosil hidrolases são secretadas por meio da indução de fontes de carbono contendo materiais lignocelulósicos. Nesse contexto o estudo das enzimas produzidas por *Clonostachys* se justifica devido a atual importância econômica desse fungo e até o presente momento não há relatos de estudos que tenham avaliado a produção de enzimas mananolíticas por meio do crescimento de *Clonostachys byssicola* na casca do grão de soja.

PROPOSTA DAS PRINCIPAIS METODOLOGIAS REALIZADAS NESTE TRABALHO

Esta tese está dividida em quatro capítulos. O primeiro é uma introdução geral que diz respeito à importância da utilização da biomassa lignocelulósica e as possíveis utilizações das mananases nos diferentes tipos de indústrias. O segundo capítulo aborda as propriedades bioquímicas das mananases presentes no extrato bruto concentrado de *C. byssicola*. O potencial das mananases em desconstruir diferentes substratos é revelado no terceiro capítulo. Por fim, o estudo de diferentes abordagens para a identificação de mananases é descrito no quarto capítulo. As principais metodologias utilizadas ao longo dos capítulos são esquematizadas na Figura 2.

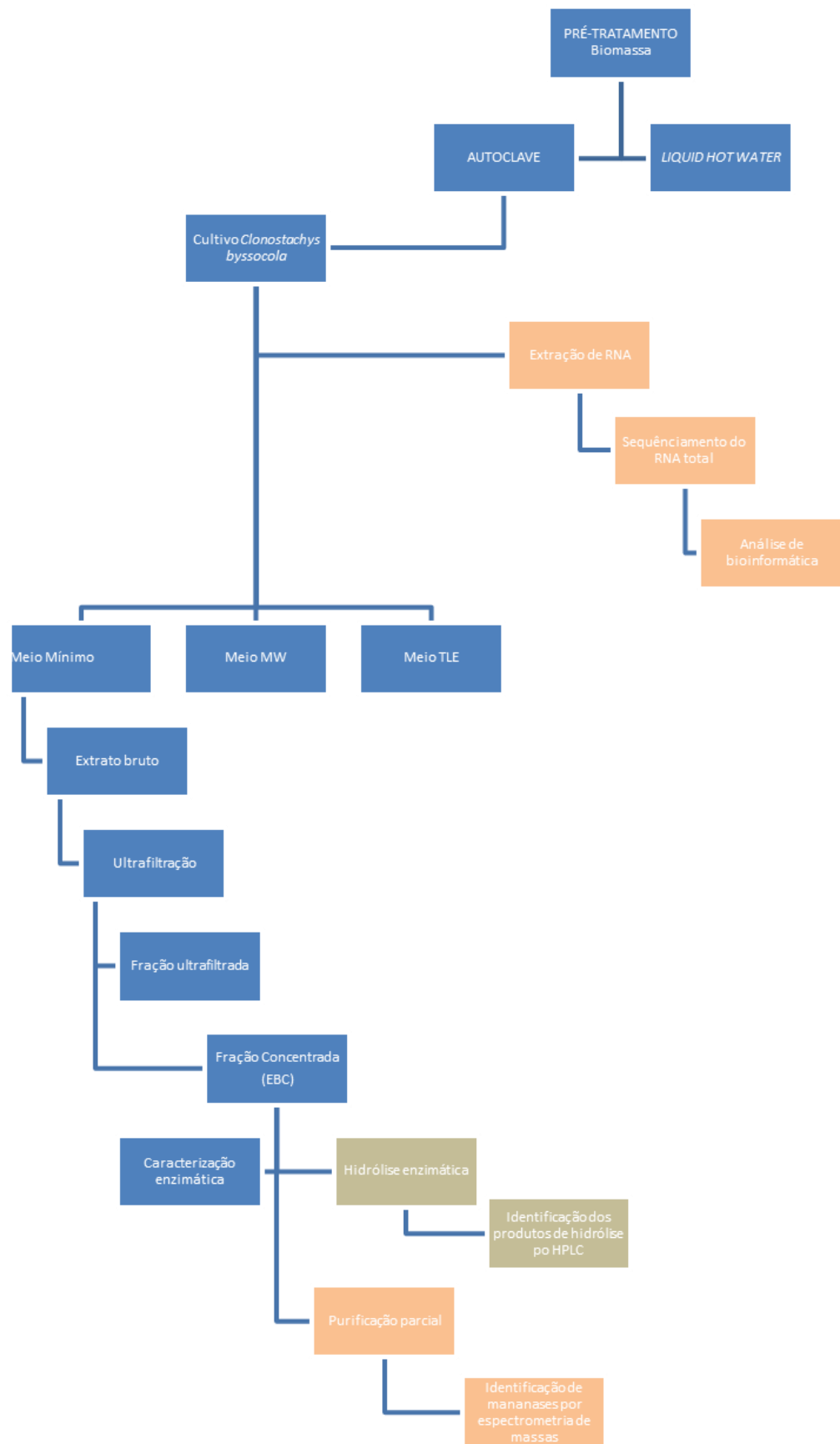


Figura 2. Esquema das principais metodologias realizadas para o estudo de mananases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesina FC, Oluboyede OA, Onilude AA (2013) Production , purification and characterisation of a β - mannanase by *Aspergillus niger* through solid state fermentation (SSF) of *Gmelina arborea* shavings. *J Microbiol Res* 7:282–289 . doi: 10.5897/AJMR11.1106
- Anderson CT (2015) We be jammin ’: an update on pectin biosynthesis , trafficking and dynamics. *J Exp Bot* 67:495–502 . doi: 10.1093/jxb/erv501
- Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D (2013) Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 64:747–749 . doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105534
- Badhan AK, Chadha BS, Kaur J, Saini HS, Bhat MK (2007) Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresour Technol* 98:504–510 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.009
- Barcelos MCS, Ramos CL, Kuddus M, Rodriguez-Couto S, Srivastava N, Ramteke PW, Mishra PK, Molina G (2020) Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. *Biotechnol Lett* 42:1799–1827 . doi: 10.1007/s10529-020-02957-3
- Benocci T, Victoria M, Pontes A, Zhou M, Seiboth B, Vries RP De (2017) Biotechnology for Biofuels Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels* 10:1–25 . doi: 10.1186/s13068-017-0841-x
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99 . doi: 10.1002/elps.1150080203
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Broberg M, Dubey M, Sun MH, Ihrmark K, Schroers HJ, Li SD, Jensen DF, Durling MB, Karlsson M (2018) Out in the cold: Identification of genomic regions associated with cold tolerance in the biocontrol fungus *clonostachys rosea* through genome-wide association mapping. *Front Microbiol* 9:1–13 . doi: 10.3389/fmicb.2018.02844
- Buckeridge MS (2018) The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. *Biosystems* 164:112–120 . doi: 10.1016/j.biosystems.2017.10.003
- Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure , function , and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Res* 344:1879–1900 . doi: 10.1016/j.carres.2009.05.021
- Cain JA, Solis N, Cordwell SJ (2014) Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics* 97:265–286 . doi: 10.1016/j.jprot.2013.08.012
- Canteri MHG, Moreno L, Wosiack G, Scheer AP (2011) Pectina : da Matéria-Prima ao Produto Final. *Polímeros* 22:149–157 . doi: 10.1590/S0104-14282012005000024.
- Chambers MC, MacLean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, Gatto L, Fischer B, Pratt B, Egertson J, Hoff K, Kessner D, Tasman N, Shulman N, Frewen B, Baker TA, Brusniak MY, Paulse C, Creasy D, Flashner L, Kani K, Moulding C, Seymour SL, Nuwaysir LM, Lefebvre B, Kuhlmann F, Roark J, Rainer P, Detlev S, Hemenway T, Huhmer A, Langridge J, Connolly B, Chadick T, Holly K, Eckels J, Deutsch EW, Moritz RL, Katz JE, Agus DB, MacCoss M, Tabb DL, Mallick P (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* 30:918–920 . doi: 10.1038/nbt.2377

- Chatterton S, Punja ZK (2009) Chitinase and β -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Candian J Microbiol* 55:356–367 . doi: 10.1139/W08-156
- Chauhan PS, Gupta N (2017) Insight into microbial mannosidases: a review. *Crit Rev Biotechnol* 37:190–201 . doi: 10.3109/07388551.2015.1128878
- Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N (2012) Mannanases : microbial sources , production , properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1817–1830 . doi: 10.1007/s00253-012-3887-5
- Chen M, Wang J, Lin L, Wei W, Shen Y, Wei D (2021) High-level expression of a β -mannanase (manB) in *Pichia pastoris* GS115 for mannose production with *Penicillium brevicompactum* fermentation pretreatment of soybean meal. *Bioprocess Biosyst Eng* 44:549–561 . doi: 10.1007/s00449-020-02467-6
- Chen X, Cao Y, Ding Y, Lu W, Li D (2007) Cloning , functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* α -mannanase in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* 128:452–461 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.11.003
- Cherubini F (2010) The biorefinery concept : using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag* 51:1412–1421 . doi: 10.1016/j.enconman.2010.01.015
- Coffman AM, Li Q, Ju L-K (2014) Effect of natural and pretreated soybean hulls on enzyme production by *Trichoderma reesei*. *J Am Oil Chem Soc* 91:1331–1338 . doi: 10.1007/s11746-014-2480-8
- Corrêa CL (2016) Estudo do transcriptoma global do fungo *Aspergillus terreus* quando cultivado em resíduos agroindustriais. Universidade de Brasília
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850–861 . doi: 10.1038/nrm1746
- Cosgrove DJ (2014) Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr Opin Plant Biol* 22:122–131 . doi: 10.1016/j.pbi.2014.11.001
- de Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS (2013) Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Res* 6:564–579 . doi: 10.1007/s12155-012-9268-1
- Dence AW, Lin SY (1992) Genera, structural features of lignin. In: Timell TE (ed) *Methods in lignin chemistry*. Springer, Berlin, pp 1–17
- Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P (2004) Guar Seed β -Mannan Synthase Is a Member of the Cellulose Synthase Super Gene Family. *Science* (80-) 303:363–366 . doi: 10.1126/science.1090908
- Dionísio M, Grenha A (2012) Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *J Pharm Bioallied Sci* 4:175–185 . doi: 10.4103/0975-7406.99013
- Doherty WOS, Mousavioun P, Fellows CM (2011) Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind Crops Prod* 33:259–276 . doi: 10.1016/j.indcrop.2010.10.022
- Dunn MJ (2004) *Electroelution of proteins from polyacrylamide gels.*, Second Edi. Humana Press, Totowa

- Ferreira-Filho EX, Puls J, Coughlan MP (1993) Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *J Ind Microbiol* 11:171–180 . doi: 10.1007/BF01583719
- Florencio C, Colli A, Farinas S (2017) Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Quim Nova* 40:1082–1093 . doi: 10.21577/0100-4042.20170104
- Frazzetto G (2003) White biotechnology. *Sci Soc* 4:835–837 . doi: 10.1038/sj.embor.embor928
- Freiesleben P V, Spodsberg N, Blicher TH, Anderson L, Jorgensen H, Stalbrand H, Meyer AS, Krogh KBRM (2016) An *Aspergillus nidulans* GH26 endo- β -mannanase with a novel degradation pattern on highly substituted galactomannans. *Enzyme Microb Technol* 83:68–77
- Fry SC (2017) Plant Cell Wall Polymers. In: Love J, Bryant JA (eds) *Biofuels and bioenergy*, 1st edn. John Wiley & Sons, pp 59–87
- Gomes HAR, Moreira LRS, Júnior ACS, Fontes W, Santana RH, Kruger RH, Valle de Sousa M, Ricart CAO, Ferreira-Filho EX (2020) Evaluation of different secretomes produced by *Clonostachys blyssicola* as tools to holocellulose breakdown. *Int Biodeterior Biodegrad* 148:104880 . doi: 10.1016/j.ibiod.2019.104880
- Gu X, Lu H, Chen W, Meng X (2021a) Characterization of a novel thermophilic mannanase and synergistic hydrolysis of galactomannan combined with swollenin. *Catalysts* 11:1–11 . doi: 10.3390/catal11020254
- Gu X, Lu H, Zhang L, Meng X (2021b) A Thermophilic GH5 Endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and its synergistic hydrolysis of mannan-containing polysaccharides. *Catalysts* 11:2–13 . doi: 10.3390/catal11070862
- Gummadi SN, Panda T (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases * a review. *Process Biochem* 38:987–996
- Guruprasad K, Reddy BVB, Pandit MW (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng Des Sel* 4:155–161 . doi: 10.1093/protein/4.2.155
- Hilge M, Gloor S, Winterhalter K, Zimmermann W, Piontek K (1996) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of two β -mannanase isoforms from *Thermomonospora fassica* KW3. *Acta Crystallogr* 52:1224–1225 . doi: 10.1107/S0907444996009006
- Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* (80-) 315:804–807 . doi: 10.1126/science.1137016
- Huang, Yao-Bing fu Y (2013) Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chem* 15:1095–1111 . doi: 10.1039/c3gc40136g
- Jana UK, Suryawanshi RK, Prajapati BP, Soni H, Kango N (2018) Production optimization and characterization of mannoooligosaccharide generating B-mannanase from *Aspergillus oryzae*. *Bioresour Technol* 268:308–314 . doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.143
- Jaramillo PMD (2014) Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo. Universidade de Brasília

- Johnson LA, White PJ, Galloway R (2008) Soybeans: chemistry, production, processing and utilization, 1st edn. AOCS Press
- Jong E de, Jungmeier G (2015) Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In: Pandey A, Höfer R, Taherzadeh M, Nampoothiri KM, Larroche C (eds) Industrial biorefineries & white biotechnology, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, p 710
- Kamm B, Kamm M (2004) Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:137–145 . doi: 10.1007/s00253-003-1537-7
- Karahalil E, Germec M, Karaoglan M, Yatmaz E, Coban HB, Inan M, Turhan I (2020) Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. *Biomass Convers Biorefinery* 10:1189–1205 . doi: 10.1007/s13399-019-00487-1
- Karlsson M, Amby DB, Lackner G, Lagopodi AL, Wang J, Kosawang C, Durling MB, Henrissat B, Choi J, Levasseur A, Vannacci G, Kamou N, Panteris E, Tzelepis GD, Zapparata A, Sarrocco S, Nygren K, Collinge DB, Dubey MK, Jensen B, Lee Y-H, Jensen DF, Hoffmeister D, Pöggeler S (2015) Insights on the Evolution of Mycoparasitism from the Genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biol Evol* 7:465–480 . doi: 10.1093/gbe/evu292
- Karp SG, Rozhkova AM, Semenova M V., Osipov DO, de Pauli STZ, Sinitsyna OA, Zorov IN, de Souza Vandenberghe LP, Soccol CR, Sinitsyn AP (2021) Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. *Bioresour Technol* 330:124888 . doi: 10.1016/j.biortech.2021.124888
- Kim D (2018) Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose : Inhibitor Effects and Detoxification Strategies : A Mini Review. *Molecules* 23:2–21 . doi: 10.3390/molecules23020309
- Kou Q, Xun L, Liu X (2016) TopPIC: A software tool for top-down mass spectrometry-based proteoform identification and characterization. *Bioinformatics* 32:3495–3497 . doi: 10.1093/bioinformatics/btw398
- Kubicek CP (2013) The plant biomass. In: Kubicek CP (ed) *Fungi and Lignocellulosic Biomass*, 1st edn. Joh Wiley & Sons, Iowa, pp 1–11
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685 . doi: 10.1038/227680a0
- Lermyte F, Sobott F (2015) Electron transfer dissociation provides higher-order structural information of native and partially unfolded protein complexes. *Proteomics* 15:2813–2822 . doi: 10.1002/pmic.201400516
- Li M, Cao S, Meng X, Studer M, Wyman CE, Ragauskas AJ, Pu Y (2017a) The effect of liquid hot water pretreatment on the chemical-structural alteration and the reduced recalcitrance in poplar. *Biotechnol Biofuels* 10:1–13 . doi: 10.1186/s13068-017-0926-6
- Li M, Yoo CG, Pu Y, Biswal AK, Mohnen D, Ragauskas AJ, Tolbert AK (2019) Downregulation of pectin biosynthesis gene GAUT4 leads to reduced ferulate and lignin- carbohydrate cross-linking in switchgrass. *Commun Biol* 2:1–11 . doi: 10.1038/s42003-018-0265-6
- Li Q, Loman A AI, Coffman AM, Ju L-K (2017b) Soybean hull induced production of carbohydrases and protease among *Aspergillus* and their effectiveness in soy flour carbohydrate and protein separation. *J Biotechnol* 248:1–8
- Liao H, Li S, Zheng H, Wei Z, Liu D, Raza W, Shen Q (2014) A new acidophilic thermostable

- endo-1, 4- β -mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2 : cloning , characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* 14:1–12 . doi: 10.1186/s12896-014-0090-z
- Liu HM, Wang FY, Liu YL (2016) Hot-compressed water extraction of polysaccharides from soy hulls. *Food Chem* 202:104–109 . doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.129
- Liu Y, Lei F, He L, Xu W, Jiang J (2020a) Comparative study on the monosaccharides of three typical galactomannans hydrolyzed by different methods. *Ind Crops Prod* 157: . doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112895
- Liu Z, Ning C, Yuan M, Fu X, Yang S, Wei X, Xiao M, Mou H, Zhu C (2020b) High-efficiency expression of a superior β -mannanase engineered by cooperative substitution method in *Pichia pastoris* and its application in preparation of prebiotic mannoooligosaccharides. *Bioresour Technol* 311:123482 . doi: 10.1016/j.biortech.2020.123482
- Liu Z, Ning C, Yuan M, Yang S, Wei X, Xiao M, Fu X, Zhu C, Mou H (2020c) High-level expression of a thermophilic and acidophilic β -mannanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with significant potential in mannoooligosaccharide preparation. *Bioresour Technol* 295:122257 . doi: 10.1016/j.biortech.2019.122257
- Lu H, Luo H, Shi P, Huang H (2014) A novel thermophilic endo- β -1, 4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3 : functional roles of carbohydrate-binding module and Thr / Ser-rich linker region. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2155–2163 . doi: 10.1007/s00253-013-5112-6
- Lu H, Luo H, Shi P, Huang H, Meng K, Yan P, Yao B (2013) A novel thermophilic endo- β -1, 4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3 : functional roles of carbohydrate-binding module and Thr / Ser-rich linker region. *Biotechnol Relev Enzym Proteins* 98:2155–2163 . doi: 10.1007/s00253-013-5112-6
- Luo H, Wang Y, Wang H, Yang J, Yang Y, Huang H, Yang P, Bai Y, Shi P, Fan Y, Yao B (2009) A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: Gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:453–461 . doi: 10.1007/s00253-008-1766-x
- Ma L, Jiang H, Li W, Qin H, Lv Z, Huang J, Hou X, Wang W (2021) Biochemical properties of a native β -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus* QH1 and partial characterization of its N-glycosylation. *Biochem Biophys Reports* 26:100922 . doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100922
- Macgregor EA (2005) An overview of clan GH-H and distantly-related families. *Biologia (Bratisl)* 16:5–12
- Mäkelä MR, Aguilar-Pontes MV, Van Rossen-Uffink D, Peng M, De Vries RP (2018) The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA. *Sci Rep* 8:1–8 . doi: 10.1038/s41598-018-25152-x
- Mäkelä MR, Bouzid O, Robl D, Post H, Peng M, Heck A, Altelaar M, de Vries RP (2017) Cultivation of *Podospora anserina* on soybean hulls results in efficient enzyme cocktail for plant biomass hydrolysis. *N Biotechnol* 37:1–10
- Mäkelä MR, Donofrio N, Vries RP De (2014) Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genet Biol* 72:2–9 . doi: 10.1016/j.fgb.2014.08.010
- Malgas S, Thoresen M, van Dyk JS, Pletschke BI (2017) Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb*

Technol 103:1–11 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.04.007

Marco JI da C, Souza-Neto GP, Castro CFS, Michelin M, Polizeli MDLTM, Ferreira-Filho EX (2015) Partial Purification and Characterization of a Thermostable β -Mannanase from *Aspergillus foetidus*. *Appl Sci* 5:881–893 . doi: 10.3390/app5040881

Mielenz JR, Bardsley JS, Wyman CE (2009) Bioresource Technology Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour Technol* 100:3532–3539 . doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.044

Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428

Mistry V V, Maubois J (2017) Application of Membrane Separation Technology to Cheese Production. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett D w (eds) *Cheese*, 4th edn. Elsevier Ltd, pp 677–697

Montibeller VW (2015) Mananase: produção por via convencional e recombinante e obtenção de produto formulado líquido. Universidade Federal do Paraná

Moreira GM (2016) DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Clonostachys* NO BRASIL LAVRAS - MG. Universidade Federal de Lavras

Moreira GM, Abreu LM, Carvalho VG, Schroers HJ, Pfenning LH (2016) Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycol Prog* 15:1031–1039 . doi: 10.1007/s11557-016-1224-6

Moreira LRS, Filho EXF (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:165–178 . doi: 10.1007/s00253-008-1423-4

Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012a) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: Show K-Y, Guo X (eds) *Industrial Waste*, 1st edn. InTech, Rijeka, p 274

Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012b) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: *Industrial waste*. pp 121–140

Nadaroglu H, Dikbas N (2018) Purification and Characterization of Linamarase from *Lactobacillus Plantarum*. *J Bacteriol Mycol* 4:1–6 . doi: 10.26420/jbacteriolmycol.2017.1045

Nevalainen H, Peterson R (2014) Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much ? *Front Microbiol* 5:1–10 . doi: 10.3389/fmicb.2014.00075

Obembe OO, Jacobsen E, Visser RGF, Vincken J-P (2006) Cellulose-hemicellulose networks as target for in planta modification of the properties of natural fibres. *Biotechnol Mol Biol Rev* 1:76–86

Ochoa-villarreal M, Aispuro-hernández E, Vargas-Arispu I, Martínez-Téllez MÁ (2012) Plant Cell Wall Polymers : Function , Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In: Gomes A de S (ed) *Polymerization*, 1st edn. Intechopen

Ostergaad LH, Olsen HS (2011) Industrial Applications of Fungal Enzymes. In: Hofrichter M (ed) *Industrial applications*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg, pp 269–290

Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238:627–642 . doi: 10.1007/s00425-013-1921-1

- Pauly M, Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J* 54:559–568 . doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x
- Penido A, Mendes P, Campos I, Mendes L (2020) *Malaysian Journal of Microbiology*. *Malays J Microbiol* 16:396–406 . doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose , hemicellulose and lignin : an overview. *Int Microbiol* 5:53–63 . doi: 10.1007/s10123-002-0062-3
- Pinto ASB (2019) Efeito gastroprotetor da gom guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e galactomanana da fava danta (*dimorphandra gardneriana*) na gastrite experimental induzida por álcool. Universidade do Ceará
- Polleto P (2015) Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo. Unversidade e Caxias do Sul
- Ponnusamy VK, Nguyen DD, Dharmaraja J, Shobana S, Banu JR, Saratale RG, Chang SW, Kumar G (2019) A review on lignon structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour Te* 271:462–472 . doi: 0.1016/j.biortech.2018.09.070
- Popper ZA (2008) Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* 11:286–292 . doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.012
- Purchart V, Vrsanská M, Svoboda P, Pohl J, Ögel ZB, Biely P (2004) Purification and characterization of two forms of endo- h -1 , 4-mannanase from a thermotolerant fungus , *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochim Biophys Acta* 1674:239–250 . doi: 10.1016/j.bbagen.2004.06.022
- Qin L, Li WC, Liu L, Zhu JQ, Li X, Li BZ, Yuan YJ (2016) Inhibition of lignin - derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnol Biofuels* 9:1–10 . doi: 10.1186/s13068-016-0485-2
- Reiter W-D (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 5:536–542 . doi: 10.1016/S1369-5266(02)00306-0
- Robles Barros PJ, Ramirez Ascheri DP, Siqueira Santos ML, Morais CC, Ramirez Ascheri JL, Signini R, dos Santos DM, de Campos AJ, Alessandro Devilla I (2020) Soybean hulls: Optimization of the pulping and bleaching processes and carboxymethyl cellulose synthesis. *Int J Biol Macromol* 144:208–218 . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.074
- Rocha hELDER A, Silva AJ, Gómez-mendoza DP, Santos Junior ACM, Cologna NM, Almeida RoM, Sousa M v, Ricart CAO, Ferreira-Filho EX (2017) Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. *J Biotechnol* 254:51–58 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.001
- Rodrigues SLc, Moreira RLDS, Cardoso MH, Merçon F (2003) AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ULTRAFILTRAÇÃO DE SUCO DE BANANA 1. *Food Sci Technol* 23:98–101
- Rodríguez MM (2016) Lignin biomass conversion into chemicals and fuels. Technical University of Denmark
- Rojas MJ (2012) Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja. Universidade Federal de São Carlos
- Roy MD, Peterson ME, Danson MJ, Price NC, Kelly SM, Monk CR, Weinberg CS, Oudshoorn ML, Lee CK (2010) The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemistry* 425:353–360 . doi: 10.1042/BJ20091254

- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour Bioprocess* 5:1–15 . doi: 10.1186/s40643-017-0187-z
- Sakai K, Mochizuki M, Yamada M, Shinzawa Y, Minezawa M, Kimoto S, Murata S, Kaneko Y, Ishihara S, Jindou S, Kobayashi T, Kato M, Shimizu M (2017) Biochemical characterization of thermostable β -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3237–3245 . doi: 10.1007/s00253-017-8107-x
- Saraiva RM, M PEF De, Borges ÁV (2014) USO E PERSPECTIVA DE *Clonostachys rosea* COMO AGENTE DE BIOCONTROLE USE AND PROSPECT OF *Clonostachysrosea* as A BIOCONTROL AGENT. *Rev Ciências Agrícolas* 31:78–91
- Schroers AH, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W, Samuels J, Seifert KA (1999) Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys as C . rosea* , its relationship to *Bionectria ochroleuca* , and notes on other fungi. *Mycologia* 91:365–385
- Schroers H (2001) A monograph of *Bionectria* and its *Clonostachys* anamorphs. Centraalbureau voor Schimmelcultuur
- Sciuto DL (2017) Cellulose-degrading enzyme production by *Clonostachys byssicola*: Partial purification and characterization of an endoglucanase. *Mycosphere* 8:415–431 . doi: 10.5943/mycosphere/8/3/4
- Sciuto D Lo (2015) Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase. Universidade de Brasília
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219–228 . doi: 10.1016/S1369-5274(03)00056-0
- Sharma M, Sangwan RS, Khatkar BS, Singh SP (2021) Development of a Prebiotic Oligosaccharide Rich Functional Beverage from Sweet Sorghum Stalk Biomass. *Waste and Biomass Valorization* 12:2001–2012 . doi: 10.1007/s12649-020-01156-5
- Sharma S, Vaid S, Bhat B, Singh S, Bajaj BK (2019) Thermostable enzymes for industrial biotechnology. In: Singh RS, Singhania RR, Pandey A, Larroche C (eds) *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier B.V., pp 469–495
- Sheng Y, Lam SS, Wu Y, Ge S, Wu J, Cai L, Huang Z, Le Q Van, Sonne C, Xia C (2021) Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresour Technol* 324: . doi: 10.1016/j.biortech.2020.124631
- Shimizu M, Kaneko Y, Ishihara S, Mochizuki M, Sakai K, Yamada M, Murata S, Itoh E, Yamamoto T, Sugimura Y, Hirano T, Takaya N, Kobayashi T, Kato M (2015) Novel β -1, 4-Mannanase Belonging to a New Glycoside Hydrolase Family in *Aspergillus nidulans* *. *J Biol Chem* 290:27914–27927 . doi: 10.1074/jbc.M115.661645
- Silva C de OG, Santos Júnior A de CM, Santana RH, Krüger RH, Fontes W, de Sousa MV, Ricart CAO, Ferreira Filho EX (2019) Mild hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse enhances the production of holocelulases by *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:1517–1529 . doi: 10.1007/s10295-019-02207-0
- Silva CD, Kazama R, Faustino JO, Zambom A, Santos GT, Branco AF (2004) Digestibilidade in vitro e degradabilidade in situ da casca do grão de soja , resíduo de soja e casca de algodão. *Anim Sci* 26:501–506
- Silva COG, Ribeiro JA de A, Souto AL, Abdelnur PV, Batista LR, Rodrigues KA, Parachin NS, Filho

- EXF (2018) Sugarcane Bagasse Hydrothermal Pretreatment Liquors as Suitable Carbon Sources for Hemicellulase Production by *Aspergillus niger*. *Bioenergy Res* 11:316–329 . doi: 10.1007/s12155-018-9898-z
- Silva COG, Vaz RP, Ferreira-Filho EX (2017) Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 12:277–289 . doi: 10.1002/bbb.1832
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS (2011a) Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. *Phytochemistry* 72:2352–2360 . doi: 10.1016/j.phytochem.2011.08.020
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS (2011b) O revestimento das samambaias. São Paulo
- Sluiter A, Hames R, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Tepleton D, Crocker D (2008a) Determination of structural carbohydrates and Lignin in biomass. Tech Rep NREL
- Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D (2008b) Chirurgie des métastases pulmonaires des cancers colorectaux : facteurs prédictifs de survie. Tech Rep NREL 0:0
- Soni H, Kumar H, Brett R, Naveen IP (2016) Purification and characterization of β -mannanase from *Aspergillus terreus* and its applicability in depolymerization of mannans and saccharification of lignocellulosic biomass. *3 Biotech* 6:1–11 . doi: 10.1007/s13205-016-0454-2
- Soni H, Rawat HK, Ahirwar S, Kango N (2017) Screening , statistical optimized production , and application of β -mannanase from some newly isolated fungi. *Eng Life Sci* 17:392–401 . doi: 10.1002/elsc.201600136
- Souza WR, Maitan-alfenas, Gabriela P Gouvêa PF, Brown NA, Savoldi M, Battaglia E, Goldman MHS, de Vries RP, Goldman GH (2013) The influence of *Aspergillus niger* transcription factors AraR and XlnR in the gene expression during growth in D -xylose , L -arabinose and steam-exploded sugarcane bagasse. *Fungal Genet Biol* 60:29–45 . doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.007
- Srivastava PK, Kapoor M (2017) Production , properties , and applications of endo - β -mannanases. *Biotechnol Adv* 35:1–19 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.001
- Sticklen MB (2008) Plant genetic engineering for biofuel production : towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* 9:433–443 . doi: 10.1038/nrg2336
- Tanimoto T, Ikuta A, Sugiyama M, Koizumi K (2002) HPLC analysis of manno-oligosaccharides derived from *Saccharomyces cerevisiae* mannan using an amino column or a graphitized carbon column. *Chem Pharm Bull* 50:280–283 . doi: 10.1248/cpb.50.280
- Tejirian A, Xu F (2010) Inhibition of Cellulase-Catalyzed Lignocellulosic Hydrolysis by Iron and Oxidative Metal Ions and Complexes \square . *Appl Environ Microbiol* 76:7673–7682 . doi: 10.1128/AEM.01376-10
- Thomas LH, Forsyth VT, Adriana Š, Kennedy CJ, May RP, Altaner CM, Apperley DC, Wess TJ, Jarvis MC (2013) Structure of Cellulose Micro fi brils in Primary Cell Walls. *Plant Physiol* 161:465–476 . doi: 10.1104/pp.112.206359
- Tian Y, Jiang Y, Ou S (2013) Interaction of cellulase with three phenolic acids. *Food Chem* 138:1022–1027 . doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.129

- Toro-trochez JL, Carrillo-pedraza ES, Bustos-Martínes D, García-mateos FJ, Ruiz-Rosas RR, Rodríguez-Mirasol J, Cordero T (2019) Thermogravimetric characterization and pyrolysis of soybean hulls. *Bioresour Technol Reports* 6:183–189 . doi: 10.1016/j.biteb.2019.02.009
- Uechi K, Watanabe M, Fujii T, Kamachi S, Inoue H (2020) Identification and Biochemical Characterization of Major β -Mannanase in *Talaromyces cellulolyticus* Mannanolytic System. *Appl Biochem Biotechnol* 192:616–631 . doi: 10.1007/s12010-020-03350-6
- Uenojo M, Pastore M (2007) Revisão. *Quim Nova* 30:388–394
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin Biosynthesis and Structure 1. *Plant Physiol* 153:895–905 . doi: 10.1104/pp.110.155119
- Vasconcellos VM, Tardioli PW, Giordano RLC, Farinas CS (2016) Addition of metal ions to (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *N Biotechnol* 33:331–337
- Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, Beldman G, Visser RGF, Voragen AGJ (2003) Pectin the hairy thing. In: Voragen F, Schols H, Visser R (eds) *Advances in Pectin and Pectinase Research*, 1st edn. Springer, Dordrecht, pp 47–61
- Visser EM, Falkoski DL, de Almeida MN, Maitan-Alfenas GP, Guimarães VM (2013) Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 144:587–594 . doi: 10.1016/j.biortech.2013.07.015
- Voragen AGJ, Coenen G-J, Verhoef RP, Schols HA (2009) Pectin , a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem* 20:263–275 . doi: 10.1007/s11224-009-9442-z
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol Adv* 23:115–129 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.11.001
- Wang NN, Liu J, Li YX, Ma JW, Yan QJ, Jiang ZQ (2021) High-level expression of a glycoside hydrolase family 26 β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for production of partially hydrolysed fenugreek gum. *Process Biochem* 100:90–97 . doi: 10.1016/j.procbio.2020.09.034
- Wessel D, Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141–143 . doi: 10.1016/0003-2697(84)90782-6
- Whistler RL (2012) Hemicelluloses. In: *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives: Third Edition*. pp 295–308
- Wingfield MJ, Beer ZWDE, Slippers B, Wingfield BD, Groenewald JZ, Lombard L, Crous PW (2012) One fungus , one name promotes progressive plant pathology. One fungus, one name Promot Progress plant Pathol 13:604–613 . doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00768.X
- Xie J, Pan L, He Z, Liu W, Zheng D, Zhang Z, Wang B (2020) A novel thermophilic β -mannanase with broad-range pH stability from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic effect with α -galactosidase on hydrolyzing palm kernel meal. *Process Biochem* 88:51–59 . doi: 10.1016/j.procbio.2019.09.029
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2010) Enzyme and Microbial Technology Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol* 46:170–176 . doi:

10.1016/j.enzmictec.2009.11.001

- Ximenes EA, Chen H, Kataeva IA, Cotta MA, Felix CR, Ljungdahl LG, Li X (2005) A mannanase , ManA , of the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* sp . strain PC-2 has carbohydrate binding and docking modules. *J Microbiol* 51:559–568 . doi: 10.1139/W05-033
- Xin D, Ge X, Sun Z, Viikari L, Zhang J (2015) Competitive inhibition of cellobiohydrolase I by manno-oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* 68:62–68 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.09.009
- Yang H, Shi P, Lu H, Wang H, Luo H, Huoqing H, Yang P (2015) A thermophilic β -mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 which broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers. *Food Chem* 173:283–289
- York WS, Darvill AG, McNeil M, Stevenson TT, Albersheim P (1986) Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol* 118:3–40 . doi: 10.1016/0076-6879(86)18062-1
- Yu S, Li Z, Wang Y, Chen W, Fu L, Tang W, Chen C (2015) High-level expression and characterization of a thermophilic β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 37:1853–1859 . doi: 10.1007/s10529-015-1848-7
- Zhang J, Zhou H, Liu D, Zhao X (2019) Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose, 1st edn. Academic Press

CAPÍTULO II

Caracterização de

mananases

INTRODUÇÃO

No Brasil, onde a agricultura é umas das principais fontes de atividade econômica, grandes quantidades de resíduos agrícolas são gerados anualmente (Florencio et al. 2017). Esses resíduos representam fontes promissoras de energias renováveis devido à abundância de polissacarídeos em sua estrutura química. Dentre os resíduos mais abundantes no Brasil está a casca de soja (Toro-trochez et al. 2019). Estudos acerca das composições químicas deste resíduo mostram que as altas porcentagens de componentes hemicelulósicos, em detrimento de baixos teores de ligninas, tornam a utilização da casca de soja vantajosa em relação a outros resíduos, dados que não são necessários a realização de pré-tratamentos severos para o afrouxamento dos componentes da parede celular vegetal.

A presença de hemicelulose na composição química da casca do grão de soja torna este resíduo um substrato para a indução de mananases por fungos filamentosos. Estes microrganismos são os principais produtores de enzimas industriais, no qual gêneros do tipo *Aspergillus* e *Trichoderma* tem sido referência para estudos acadêmicos (Mäkelä, Donofrio e Vries 2014). No entanto, um pequeno número de ascomicetos tem sido investigado e adaptado para aplicações industriais (Benocci et al. 2017).

A exploração a diversidade da diversidade de fungos para a identificação de novas linhagens produtoras de mananases é uma alternativa para reduzir os custos desses biocatalizadores, por meio do aumento da produção enzimática e fontes de carbonos acessíveis (Florencio, Colli e Farinas 2017).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PAREDE CELULAR

A parede celular dos materiais lignocelulósicos é representada, principalmente, pela interação físico química da celulose, hemicelulose e lignina (York et al. 1986). A celulose e a hemicelulose pertencem um complexo grupo de polissacarídeos, os quais constituem grande parte da matéria orgânica renovável do planeta (Dhugga et al. 2004). Destes, 30% correspondem a componentes hemicelulósicos. Dentre suas funções a parede celular não é somente responsável pela rigidez das plantas, mas desempenha

papéis fundamentais no crescimento, diferenciação celular, comunicação intercelular e defesa (Cosgrove 2005).

Descrita como uma estrutura dinâmica, a parede celular é composta por três tipos de camadas: a lamela média, parede celular primária e secundária (Figura 3). Formada nas etapas finais da divisão celular, a lamela média cria um limite entre as duas células filhas e, uma vez completa, inicia-se o crescimento da parede celular primária. A deposição da parede celular primária é suspensa apenas quando a célula finaliza seu processo de crescimento e expansão, resultando em uma fina camada com menos de 1 μ m de espessura, mas forte o suficiente para impedir seu rompimento. A parede celular primária é constituída principalmente por celulose, hemicelulose e pectina. Enquanto a celulose é sintetizada na membrana plasmática na forma de microfibrilas, os demais polissacarídeos são produzidos nas cisternas do complexo de Golgi e, posteriormente, são exportados, por exocitose, para a parede celular (Popper 2008; Reiter 2002).

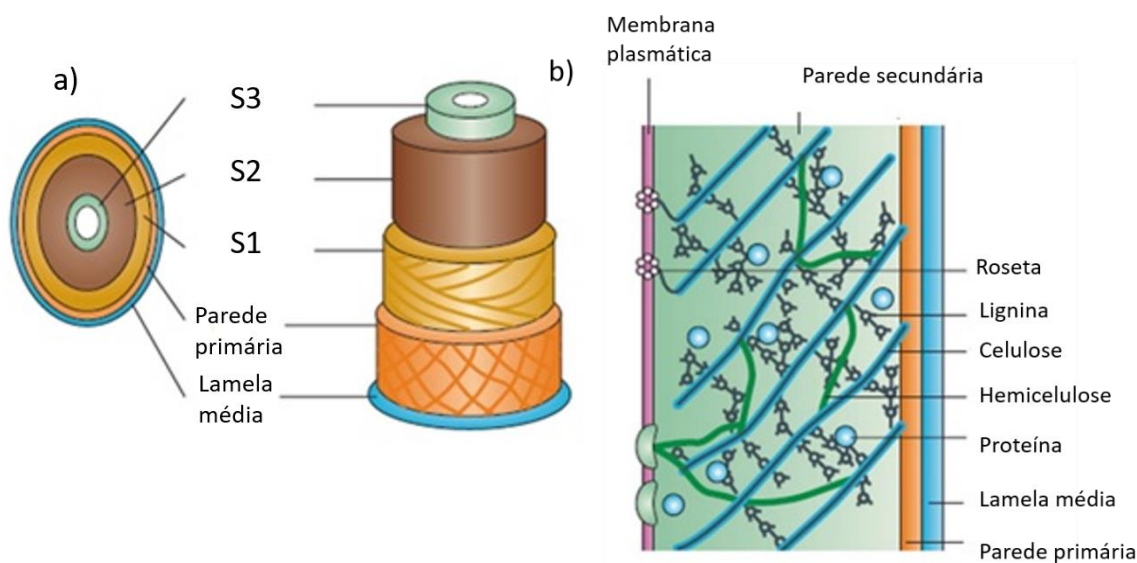


Figura 3. Configuração da parede celular vegetal. a) Camadas da Parede celular vegetal; b) Componentes lignocelulósicos da parede celular vegetal. Extraído de Sticklen (2000).

Seguidamente ao término da expansão celular, a deposição da parede celular secundária entre a membrana plasmática e a parede celular primária pode atingir uma espessura de até 20 μ m (Fry 2017). Quando presente em algumas plantas, a parede celular secundária é composta por sucessivas camadas denominadas S1, S2 e S3, nas quais os espaços entre seus polissacarídeos são preenchidos por polímeros aromáticos (lignina)

que conferem hidrofobicidade à matriz da parede celular, como também fortalecem os tecidos e aumentam a rigidez das plantas (Kubicek 2013).

A composição da parede celular dos resíduos agrícolas pode variar, dependendo do tipo de planta, refletindo alguns casos de distâncias evolutivas entre eles. Estudos acerca da composição da parede celular primária permitem concluir que todas as plantas vasculares contêm xiloglucanas, arabinoxilanas e glicomananas, mas em diferentes proporções, nas quais três tipos podem ser observados (Silva *et al.* 2011a). Nas eudicotiledôneas e monocotiledôneas não comelinóides, o principal componente hemicelulósico é o xiloglucano, compondo cerca de 20% do peso total dos açúcares, caracterizando a parede celular primária do tipo 1 (Figura 4). Na parede celular primária do tipo 2, representado pela ordem Poales, há predominância de arabinoxilano e são revestidas por ácido ferúlico e baixos teores de pectina. Um terceiro tipo de parede celular primária foi encontrado em uma espécie de samambaia (*Adiantum raddianum*) em que a manana é o principal componente hemicelulósico da parede (Pauly e Keegstra 2008; Silva *et al.* 2011a).

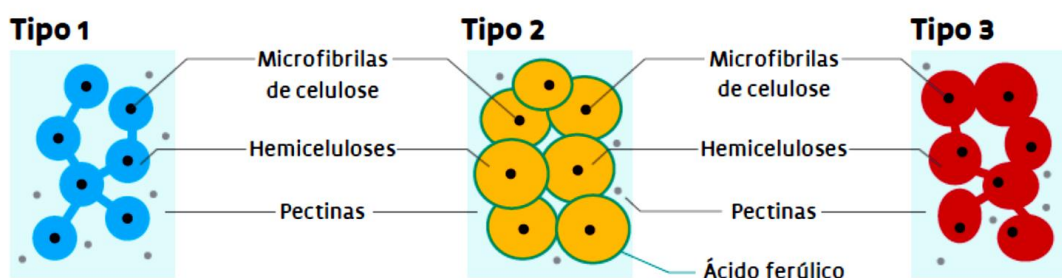


Figura 4. Classificação dos diferentes tipos de parede celular primária. Extraído de Silva *et al.* (2011b).

CELULOSE

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da natureza, compondo cerca de 15-30% do peso seco da parede primária e até 40% da parede secundária das células vegetais (Pérez *et al.* 2002; Sticklen 2008). A molécula de celulose é um homopolímero linear consistindo de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) (Figura 5). Juntas, as cadeias de celulose formam microfibrilas que podem assumir duas diferentes formas: forma cristalina ou ordenada, é uma estrutura insolúvel, e a forma

amorfa sem arranjo definido e mais suscetível a hidrólises enzimáticas (Ochoa-villarreal et al. 2012). Nas plantas, a principal função da celulose é desempenhar um papel estrutural dentro de uma arquitetura complexa da parede celular.

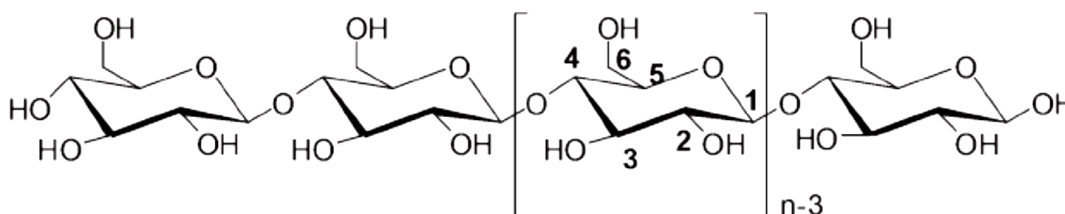


Figura 5. Ilustração esquemática da estrutura da celulose (Huang, Yao-Bing fu 2013).

Devido à ausência de ramificação, o empacotamento das microfibrilas de celulose pode assumir uma variedade de conformações com superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas que permitem a interação com outros componentes da parede celular (Kubicek 2013, Cosgrove 2014). Na parede celular primária, a celulose assume uma forma menos cristalina, quando comparado à parede celular secundária; acredita-se que essa cristalinidade tem uma relação direta com o diâmetro das microfibrilas e com as interações de hidrogênio e forças de *Van der Waals* presentes nas suas estruturas (Thomas et al. 2013).

HEMICELULOSE

Os polissacarídeos hemicelulósicos, geralmente, constituem em torno de 20-30% da parede celular, ou seja, aproximadamente um terço da biomassa da parede celular. A presença dessas moléculas pode variar em quantidade e estrutura dependendo do tipo da planta e tecido analisados. A designação “hemi” foi atribuída pelos primeiros investigadores por acreditarem que as hemiceluloses eram celuloses parciais. Contudo, sabe-se que esses polissacarídeos são partes individuais e integradas da parede celular da planta, exibindo função estrutural. Grande parte dos componentes hemicelulósicos estão presentes na parede celular primária. Eles são constituídos de longas cadeias, geralmente ramificadas, contendo diferentes tipos de açúcares e abarcam heteromananas, mananas, xilanas e heteroxilanas. Classes de hemicelulose são nomeadas de acordo com a unidade de açúcar principal contida no esqueleto carbônico (Figura 6), podendo ser identificados

polímeros de pentoses contendo em sua estrutura xilose e arabinose, ou polímeros de hexoses contendo açúcares como as manoses, glicoses e galactoses. Enquanto em gimnospermas, a hemicelulose predominante é a galactoglicomanana, nas angiospermas a hemicelulose mais abundante é parcialmente acetilada (acetilglucoronoxilanas). Com exceção de algumas hemiceluloses encontradas em angiospermas, a maioria desses polissacarídeos heterogêneos são pequenas moléculas contendo até 200 resíduos de monossacarídeos (Moreira e Filho 2008; Whistler 2012; Pauly et al. 2013).

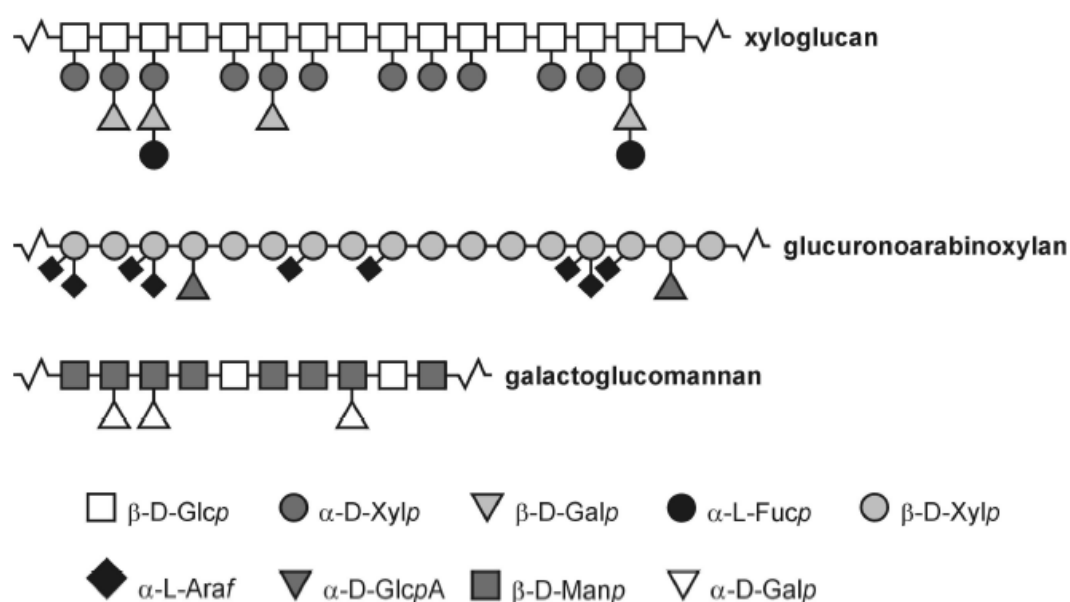


Figura 6. Estrutura dos principais componentes hemicelulósicos encontrados em plantas. As cadeias hemicelulósicas esquematizadas podem conter em sua estrutura resíduos de glicose, manose, xilose, arabinose e galactose (Obembe et al. 2006).

Diferente da celulose, todos os tipos de hemicelulose de manana são sintetizados no complexo de Golgi com a ação de pelo menos duas enzimas: a manana sintase (que adiciona GDP-manose a cadeia de manana e a galactosiltransferase (que adiciona o nucleotídeo açúcar UDP-galactose a estrutura da manana). Uma vez que os polissacarídeos da matriz celular são secretados na parede, eles associam-se às microfibrilas de celulose, formando uma rede com interações físico-químicas espontâneas (Pauly et al. 2013). Dhugga et al. (2014) descobriram a primeira manana sintase, membro da família da celulose sintase tipo A. A relação filogenética entre manana sintase e celulose sintase fornecem evidências bioquímicas que a enzima responsável por sintetizar manana se diferenciou para produção de polissacarídeos de reserva da parede celular (Dhugga et al. 2004).

PECTINA

Os polissacarídeos pécticos estão entre os mais complexos da parede celular vegetal. Compostos por 17 tipos de diferentes monossacarídeos, essas macromoléculas podem conter mais de 20 ligações incomuns. Denominados como complexos coloidais de polissacarídeos ácidos, as pectinas são constituídas por resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações do tipo α -(1,4), nas quais podem conter ramificações parcialmente esterificadas por grupos metil éster ou neutralizadas por uma ou mais bases. Geralmente, a porcentagem dos componentes pécticos nas paredes celulares primárias de eudicotiledôneas (~35%) é maior do que em monocotiledôneas como as gramíneas (2-10%). Contudo, quando analisamos a composição química da parede celular de algumas frutas e vegetais, o teor de pectina pode ser substancialmente maior (Voragen et al. 2009).

As substâncias pécticas são macromoléculas de alto peso molecular podendo atingir um tamanho de até 360 kDa. As características químicas das pectinas podem influenciar em inúmeras propriedades da parede celular como porosidade, carga de superfície, pH e balanço de íons. Dentre suas funções, as pectinas são responsáveis pela adesão das células (uma vez que esses polissacarídeos são uns dos maiores componentes da lamela média), fornecem suporte estrutural aos tecidos da parede celular primária, influenciam nas respostas de defesa da planta (eles acumulam fitoalexinas, compostos químicos com propriedades anti-microbianas), como também é um polímero de hidratação, afetando as propriedades viscoelásticas da parede celular (Voragen et al. 2009; Uenojo and Pastore 2007; Atmodjo, Hao e Mohnen 2013).

Do mesmo modo que as hemiceluloses, as pectinas são sintetizadas no complexo de Golgi. Contudo, devido à complexidade dos polissacarídeos pécticos, são pressupostos que mais de 65 atividades enzimáticas estejam envolvidas para a síntese dessas macromoléculas. UDP-ácido galacturônico, GDP-ramnose, UDP-arabinose, UDP-xilose, UDP-glicose, UDP-galactose, GDP-fucose e GDP-manose, são os nucleotídeos-açúcares envolvidos na síntese desses polissacarídeos (Anderson 2015). Recentemente, o *Knockdown* do gene Galacturonosiltransferase-4 pertencente à família dos genes responsáveis pela codificação de enzimas que sintetizam polissacarídeos pécticos, mostram que a redução da expressão da homogalacturonana e da ramnogalacturonana II está diretamente relacionada com a diminuição da recalcitrância da parede celular e com uma maior facilidade de acesso à celulose (Li et al. 2019).

Com base na composição de monossacarídeos e nas análises da ligação de

polissacarídeos pécticos solubilizados e purificados, esses açúcares são agrupados em três domínios (Figura 7): homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II, nos quais esses domínios estão covalentemente ligados um ao outro na parede celular vegetal.

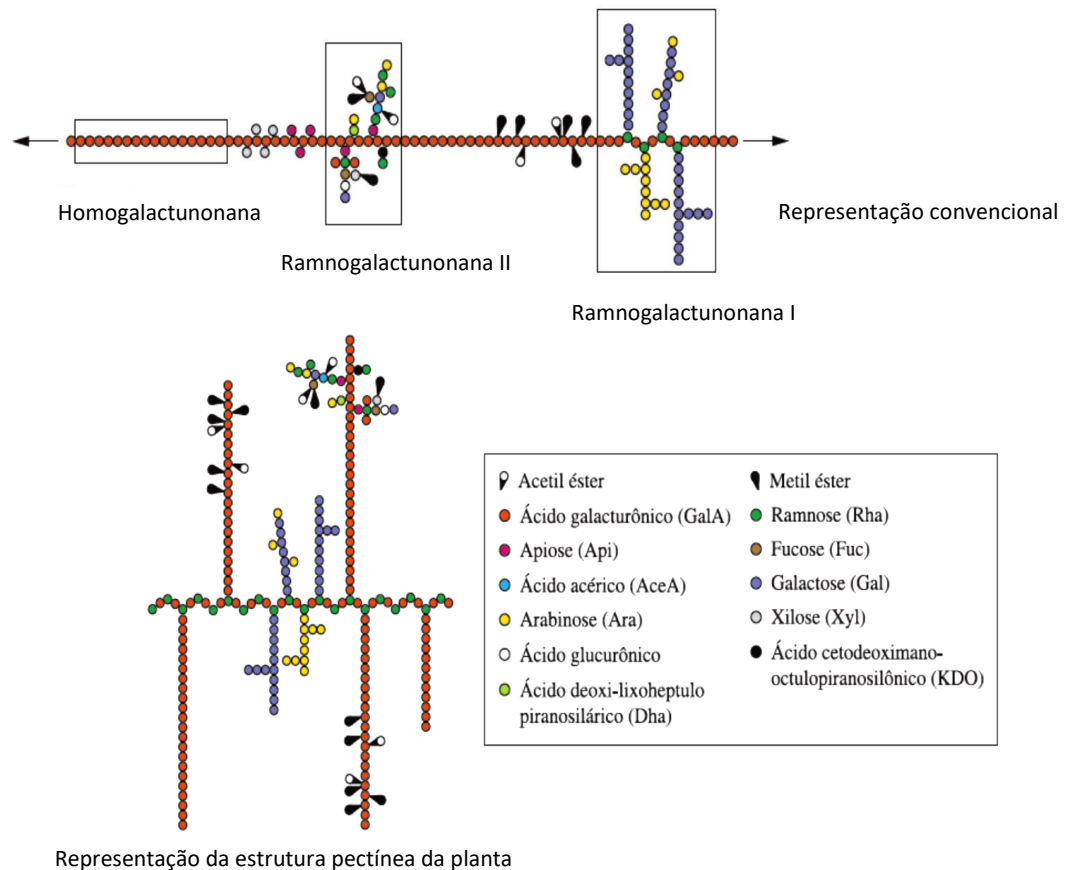


Figura 7. Ilustração esquemática dos principais polissacarídeos pécticos (Canteri et al. 2011).

Homogalacturonanas são compostas por cadeias lineares de resíduos de ácido galacturônico, representando os polissacarídeos pécticos mais abundantes da parede celular e correspondendo a cerca de 60% do total das pectinas. A estrutura de homogalacturonanas pode conter radicais metil esterificados nos grupos carboxilas do carbono 6 dos resíduos de D-galactorunil e O-acetilações no carbono 2 e 3. A metil-esterificação juntamente com sua distribuição interfere nas propriedades físicas da pectina. Por exemplo, mais de 10 resíduos de ácidos galacturônico não esterificados podem interagir com Ca^{2+} formando géis estáveis com outras moléculas de pectina (Caffall e Mohnen 2009). Um componente que pode ser encontrado como substituinte lateral desse domínio, mas pouco relatado na literatura, é a xilogalactorunona, encontrado

especificamente em órgãos reprodutivos das plantas, como frutas e sementes (Vincken et al. 2003).

Ramnogalacturonanas I representam em torno de 20-35% dos componentes pectínicos da parede celular. Sua estrutura química é formada por resíduos alternados de ácido galacturônico e ramnose, no qual O-acetilações nos carbonos 2 e 3 podem ser encontradas nos resíduos de D-galacturonil e oligossacarídeos podem substituir resíduos de ramnose em O4 (Atmodjo, Hao e Mohnen 2013). Ramnogalacturonana II constitui uma pequena fração dos polissacarídeos pectíneos, compondo apenas 10% da pectina. A conservação do esqueleto carbônico desse domínio, na maior parte das espécies vegetais, tem evidenciado a complexidade de sua estrutura, em que as cadeias de homogalacturonana integram até doze tipos diferentes de açúcares como, apiose, ácido acérico, ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico, dentre outros (Canteri *et al.* 2011)

LIGNINA

A lignina é o terceiro maior componente da biomassa lignocelulósica. Sua deposição ocorre principalmente durante o espessamento da parede celular secundária, podendo transcorrer de forma natural, evento programado pela célula, ou de forma induzível, em consequência de condições de estresses bióticos ou abióticos. A estrutura complexa da lignina está relacionada com a presença de seus constituintes básicos que formam redes amorfas tridimensionais de alto peso molecular, conferindo à planta resistência mecânica, suporte estrutural (aumentando a recalcitrância da parede) e natureza hidrofóbica. (Vanholme et al. 2010; Ponnusamy et al. 2019). Sintetizada por uma grande quantidade de plantas e algumas espécies de algas, o conteúdo de lignina pode variar de 24-33% em gimnospermas, 19-28% em angiospermas de zonas temperadas e 26-35% em angiospermas de zonas tropicais (Dence e Lin 1992).

A estrutura da lignina é formada pela polimerização de unidades fenólicas, monolignóis, de álcoois coniferil, sinapil e p-coumaril (Figura 8). Uma vez incorporado no polímero da lignina três tipos de compostos são formados: p-hidroxilfenil, guaiacil e siringil. Dependendo do tipo de planta, a proporção desses monolignóis pode variar. A lignina de gimnosperma é composta por quase exclusivamente unidades de guaiacil. Em contrapartida, nas angiospermas monolignóis de siringil e guaiacil são preponderantes, apresentando porcentagens de 45-75% e 25-50%, respectivamente. Nas monocotiledôneas, os três tipos de álcoois podem ser encontrados (Vanholme et al. 2010;

Rodríguez 2016).

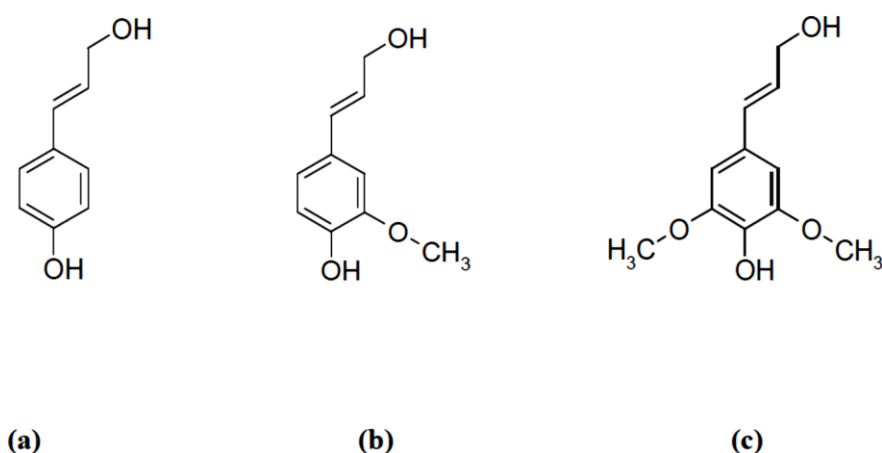


Figura 8. Precursores da lignina. a) Álcool p- coumarílico; b) Álcool coniferílico; c) Álcool sinapílico (Doherty, Mousavioun e Fellows 2011).

DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA POR FUNGUS

Durante o crescimento em biótopos naturais, os fungos são defrontados com uma complexidade de fontes de carbono, que induzem a expressão de genes necessários para degradação extracelular de polissacarídeos e subsequente conversão metabólica intracelular dos resíduos de açúcares (Mäkelä et al. 2018). A secreção de proteínas por fungos filamentosos ocorre principalmente por meio da região apical da hifa fúngica, mas da mesma forma há indícios que as regiões sub-apicais desempenham a mesma função (Figura 9). Uma característica da indução de proteínas é que ela está profundamente associada ao crescimento de fungo. Níveis reduzidos de crescimento estão relacionados com o aumento na quantidade de produção de proteínas extracelulares, dado que a escassez de nutrientes induzirá a secreção de enzimas como uma forma de obter produtos metabolizáveis (Nevalainen e Peterson 2014).

A expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação de celulose, heteroxilanas e heteromananas é regulada pela ativação de fatores transcricionais. Esses fatores são ativados pela hidrólise de pequenas porções dos substratos por enzimas constitutivas. Uma vez ativados, os reguladores agem de maneira coordenada para expressarem enzimas apropriadas ao longo do tempo. Estudos acerca da degradação da biomassa lignocelulósica, por fungos, mostram que durante o crescimento

desses microrganismos em culturas contendo resíduos agroindustriais, há preferências por determinados tipos de açúcares ao longo do crescimento (Benocci *et al.* 2017). Souza *et al.* (2013) mostraram que quando *Aspergillus niger* é cultivado em meio contendo bagaço de cana de açúcar, a glicose é o primeiro açúcar assimilado. Seguidamente, a xilose e arabinose são utilizadas.

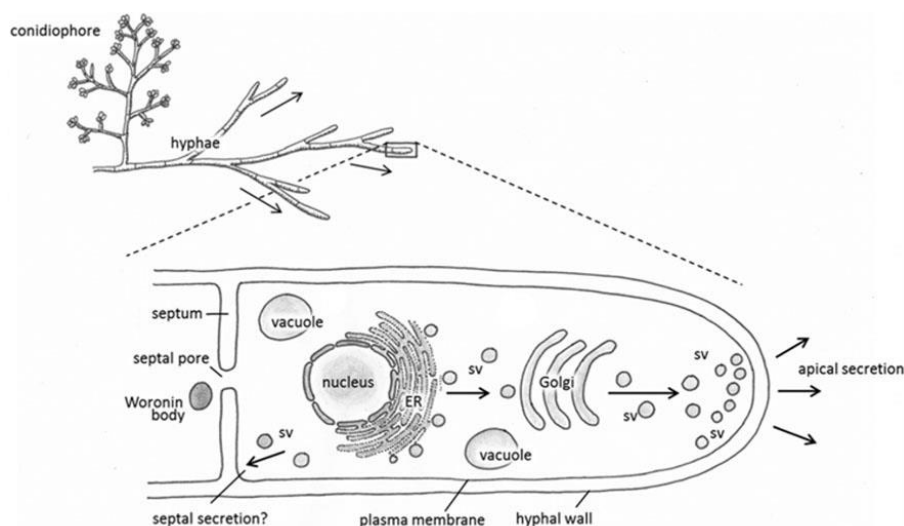


Figura 9. Modelo de secreção das enzimas celulolíticas por fungos filamentosos (Nevalainen e Peterson 2014).

As enzimas responsáveis por degradarem a biomassa lignocelulósica são agrupadas dentro de várias famílias, classificadas com base na similaridade de suas seqüências de aminoácidos pela plataforma de enzimas ativas por carboidratos (CAZY). As principais famílias do CAZY envolvidas na degradação das estruturas lignocelulósicas são as Glicosil hidrolases (GHs), Polissacarídeo liases (PLs), Carboidratos esterases (CEs) e as famílias de Atividades auxiliares (AA). Dentro dessas famílias é encontrada uma diversidade de enzimas necessárias, provenientes de fungos, para a degradação completa de polissacarídeos da parede celular. Dentre elas podem ser citadas, as celulases (endoglicanases, celobiohidrolases), pectinases (endopoligalacturonases, exopoligalacturonases, protopectinases, pectinas esterases), xilanases (endoxilanases, exoxilanases, α -L-arabinofuranosidase), mananases (endomananases, exomananases, α -galactosidases) e ligninases (enzimas oxidativas) (Shallom e Shoham 2003).

Devido à complexidade da hemicelulose, a ação combinada de um arsenal enzimático é necessária para sua completa degradação. As enzimas que degradam as mananas são glicosil hidrolases e carboidrato esterases. Com relação ao seu modo de ação

podem ser descritos dois tipos de enzimas: as endo-hidrolases que clivam ligações glicosídicas localizadas no interior da molécula e as exo-hidrolases responsáveis por romperem ligações glicosídicas terminais não redutores (Moreira e Filho 2008).

A maioria das enzimas envolvidas na hidrólise das mananas lineares são β -mananases e β -manosidases (Figura 10). As β -mananases clivam aleatoriamente ligações glicosídicas internas da cadeia principal da manana, liberando oligossacarídeos como produtos finais e produzindo novas cadeias com extremidades não redutoras. Esses oligossacarídeos são degradados à manose ou manobiose por enzimas denominadas β -manosidases. Essas são exo-hidrolases que atacam extremidades não redutoras dos oligossacarídeos. Componentes adicionais da estrutura, como a glicose, galactose e grupos acetil encontrados em glicomananas e galactoglicomananas são removidos por β -glicosidases, α -galactosidases e acetil manana esterase, respectivamente (Moreira e Filho 2008).

β -mananases pertencem às famílias 5, 26, 45, 113 e 134 de GHs (CAZY). O aumento do conhecimento da estrutura proteica dessas enzimas permitiu uma unidade de classificação maior (clã) que pudesse agrupar duas ou mais famílias que apresentassem a mesma dobra tridimensional para o seu módulo catalítico (Macgregor 2005). Com exceção da família 134 de GHs (devido à ausência de informações sobre a estrutura proteica dessas enzimas), as demais famílias pertencem ao clã A de GHs e contêm um enovelamento do domínio catalítico do tipo de barril (β/α)₈ (Chauhan e Gupta 2017). Além do mais, a maioria dessas enzimas são modulares. Acredita-se que o módulo de ligação a carboidrato (CBM) aumente a atividade enzimática, pois eles auxiliam o domínio catalítico a se ligarem ao substrato (Macgregor 2005).

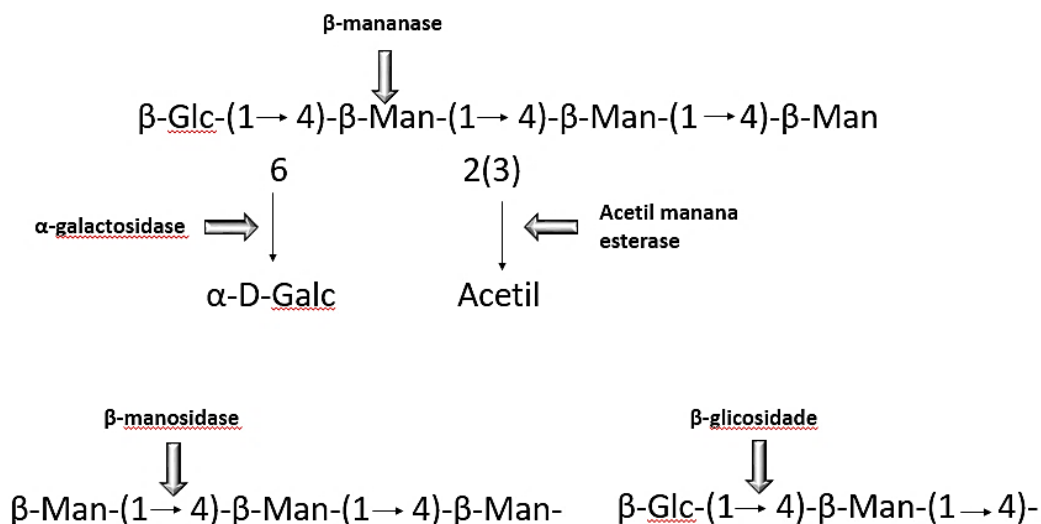


Figura 10. Hidrólise enzimática de manana (Chauhan et al. 2012).

As mananases microbianas são principalmente enzimas extracelulares, cuja produção é grandemente influenciada por fatores nutricionais e físico-químicos, tais como tempo de incubação, temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, agitação e concentração de oxigênio (Moreira e Filho 2008). Essas enzimas catalisam importantes reações metabólicas, como a degradação de matérias vegetais em decomposição para fins nutricionais juntamente com as β -manosidasases (Chauhan e Gupta 2017), portanto constituem ferramentas biotecnológicas potenciais para a indústria.

Dada a propriedade de atuar em uma ampla faixa de pH e temperatura, as mananases podem ser utilizadas em diferentes processos biotecnológicos (Chauhan et al. 2012). Recentemente, mananases têm sido utilizadas para a produção de manooligosacarídeos que são empregados como prebióticos aumentando o conteúdo probiótico fecal. Ademais, o emprego de mananases em ração de animais contribui para melhorar a digestibilidade dos alimentos, aumentando a absorção de nutrientes. A redução da viscosidade do extrato do café, o branqueamento de polpas de celulose para obtenção do papel e a remoção de manchas presentes em roupas devido à ligação de polissacarídeos a partículas sólidas são uma das várias aplicações de β -mananases (Soni et al. 2017)

O GÊNERO CLONOSTACHYS

Clonostachys é um fungo pertencente à ordem Hypocreales, família Bionectriaceae e filo Ascomycota. Caracterizado como um organismo cosmopolita, *Clonostachys* pode estar presente naturalmente no solo, em associação com plantas ou parasitando outros microrganismos. Esse gênero de fungo já foi relatado em matas, campos, florestas, água-doce e solos litorâneos com temperatura de crescimento variando entre 18-30 °C. A maioria das espécies descritas no gênero é caracterizada pela formação de colônias com coloração alaranjada (fase assexuada). Os conídios, produzidos por conidióforos penicilados arranjados em cadeia, são hialinos, unicelulares e assimétricos (Saraiva, M, e Borges 2014; Schroers et al. 1999)

Anteriormente *Clonostachys* era classificado como anamorfo do gênero *Bionectria* (fase sexuada do fungo encontrado em casca de árvores em estado de decomposição com formação de peritécios laranja ou marrom). Mas com o fim da nomenclatura dupla para fungos, a designação anamorfo e teleomorfo entra em desuso (Wingfield et al. 2012). O Código internacional de nomenclatura de algas, plantas e fungos, propõem a utilização de *Clonostachys* para holomorfos (designação adotada para a descrição morfológica de todas as formas associadas ao ciclo de vida do fungo), visto que a espécie *Clonostachys rosea* é a mais bem definida, atualmente, e utilizada para diversos estudos biológicos (Moreira 2016)

Estudos acerca das diversidades de espécies do gênero mostram que mais de 40 cepas de *Clonostachys sp.* foram encontradas em diferentes ambientes dentro do Brasil. Dentre as espécies estudadas *C. rosea* é a mais conhecida devido a sua característica de atuar como agente de controle biológico (Moreira 2016), no qual esses microrganismos podem parasitar, conídios, escleródios e hifas de outros fungos. Além disso, esses fungos podem parasitar nematoides e também são considerados como entomopatogênicos, podendo parasitar insetos. O sucesso obtido pela utilização de *C. rosea* no controle de *Botrytis cinerea* tem estimulado a busca por novos isolados mostrando que algumas espécies endofíticas estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento de algumas plantas. Em vista destas características, a comercialização de alguns produtos à base desses fungos tem crescido tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos, registrados como Clonosnat e Endofine, respectivamente (Saraiva, M e Borges 2014).

Apesar da eficiência de *Clonostachys* como agente de controle biológico em vários organismos, contribuindo para uma agricultura economicamente estável e

ecologicamente sustentável, a produção de GHs por estes micro-organismos ainda é pouco relatada na literatura. Sabe-se que algumas enzimas como proteases, glicanases e quitinases são produzidas por este fungo no processo de interação biológica entre espécies para a degradação de componentes da parede celular (Chatterton e Punja 2009). O sequenciamento de diferentes amostras de *C. rosea* e os estudos de comparações genômicas entre as diferentes espécies do gênero *Clonostachys* feito por Broberg et al. (2020), mostraram a presença de diversas enzimas como GHs, AAs e PLs; No entanto, a investigação sobre o uso de materiais lignocelulósicos para a indução de enzimas hemicelulolíticas por *C. byssicola* ainda é uma abordagem promissora para futuros estudos de aplicações biotecnológicas.

CASCA DE SOJA

A soja é uma planta pertencente à classe dicotiledônea, família Fabaceae e gênero *Glycine* e atualmente está entre as plantas mais cultivadas no mundo, com uma produção anual de 337,289 milhões de toneladas do grão. O Brasil é o maior produtor mundial de soja com uma área de 38.5 milhões de hectares cultivado na safra de 2019/2020, e totalizando uma produção de 35,9 milhões de toneladas CONAB, 2021 (<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>).

A casca de soja é um subproduto da extração do óleo de soja e constitui em torno de 8% de todo o grão (Johnson, White e Galloway 2008). Estima-se que por cada tonelada de soja processada são obtidos cerca de 2% de resíduos na forma casca de soja. A casca é constituída por uma fina camada que reveste o grão, denominada tegumento, apresenta alto valor nutricional, pois possui fornecimento energético comparável ao do milho e uma considerável digestibilidade de suas fibras. Por outro lado, em consequência da pequena porcentagem de lignina, a casca de soja é uma fonte alternativa para a produção de açúcares fermentescíveis (Rojas 2012).

A avaliação da composição química da casca de soja como resíduo para diferentes autores (tabela 1), mostra que esses valores podem variar de forma significativa, pois não há um padrão na moagem das indústrias de soja (Rojas 2012).

Tabela 1. Composição química da casca do grão de soja.

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
38,4	10,2	2,8	Mielenz <i>et al.</i> , 2009
39,7	25,5	9,1	Cassales <i>et al.</i> , 2011
35,8	23,1	9,1	Rojas et al, 2014
28,6	20,0	13,1	Qing et al., 2017
39,0	24,0	12,0	Cortivo et al., 2018

As características químicas e o padrão de fermentação ruminal da casca de soja classificam este resíduo como fibras facilmente digestíveis, responsáveis por manter a quantidade de energia e o teor de fibras da dieta (Silva et al. 2004). Em razão dessas propriedades a casca de soja tem ganho uma considerável atenção na alimentação de ruminantes e suínos, essencialmente onde a escassez de forragem limita a produtividade desses animais. Contudo, vários trabalhos têm mostrado o potencial da casca de soja para indução de enzimas hidrolíticas (Mielenz et al. 2009)

OBJETIVO

Caracterizar bioquimicamente as mananases presente no extrato bruto concentrado de *Clonostachys byssicola* cultivado em casca do grão de soja para revelar suas potencialidades biotecnológicas.

MATERIAIS

MICROORGANISMO

C. byssicola foi obtido por meio de amostras de solo, coletadas em uma fazenda no entorno do Distrito Federal em área de cerrado preservada. Foi feita a identificação molecular pela Dra. Rosane Mansan Almeida, do Laboratório de Microbiologia sob a supervisão do Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller. Este fungo faz parte da micoteca do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, UnB. A autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético é de nº 010237/2015-1.

A micoteca também foi depositada no banco de microrganismos para controle de patógenos e plantas daninhas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A micoteca do laboratório de Enzimologia é também registrada no Centro Mundial de Dados para Micro-organismos (WDCM), sob o código MCPPW 1128.

SUBSTRATOS

Os seguintes substratos foram utilizados nos ensaios enzimáticos de mananase, xilanase, carboximetilcelulase (CMCase) e pectinase, respectivamente: manana 1% (galactomanana – *locust bean*), xilana 1% (*oat spelt xylan*), carboximetil-celulose 4% (CMC), pectina 1% (*citrus fruit*), adquiridos da Sigma – Aldrich (St. Louis, MO. USA).

METODOLOGIA

CULTIVO DO FUNGO

C. byssicola foi cultivado em placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA) com 10% de batata, 1% de dextrose e 2% de ágar e mantido em temperatura ambiente até a esporulação.

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO NA INDUÇÃO DE MANANASES

A casca de soja da espécie *Glicine Max* utilizada como fonte de carbono nas culturas foi obtida da fazenda tropical em Cabeceiras, GO. A casca foi submetida a diferentes pré-tratamentos antes de utilizá-la como fonte de carbono nas culturas do fungo, como descrito nas condições abaixo:

CONDIÇÃO 1 (PRÉ-TRATAMENTO EM AUTOCLAVE):

Uma quantidade de 100 g da casca de soja foi autoclavado em erlenmeyer contendo 2 litros de água destilada a 121°C por 2 h. Em seguida, a casca de soja foi lavada em água corrente e colocada para secar em estufa a 60 °C por 36 h. Após esse procedimento, a casca de soja foi triturada em moinho de bancada, embalada em saco

plástico e armazenada em caixa de isopor à temperatura ambiente. A casca de soja pré-tratada, posteriormente foi utilizada como fonte de carbono para o cultivo do fungo em meio mínimo suplementado.

CONDIÇÃO 2 (PRÉ-TRATAMENTO COM ÁGUA QUENTE):

A casca de soja moída foi incubada com água destilada, em cilindro de aço inoxidável vedável de volume interno de 300 mL na concentração de 1%, temperaturas variáveis (140, 160 e 230 °C) e tempos de incubação de 5 a 30 min. Os cilindros vedados contendo a biomassa e água foram aquecidos em um banho de areia fluidizado Tecam SBL-2 (Cole Parmer; Vernom Hills, IL, EUA) capaz de atingir altas temperaturas. Após a incubação, os cilindros foram resfriados em água gelada por 5 min. A fração líquida foi separada do sedimento por filtração a vácuo utilizando funil Büchner e papel filtro (whatman nº 1). A fração líquida, chamada de licor, foi centrifugada por duas vezes por 10 min a 5000 rpm e armazenada a -20 °C até ser utilizada para o cultivo. Todos os pré-tratamentos foram feitos em triplicata. Os licores obtidos após os pré-tratamentos da casca de soja foram utilizados como meio de cultura para o crescimento de *Clonostachys byssicola* e produção de enzimas. Os licores foram utilizados, sem modificações.

CULTIVOS EM FRASCOS ERLLENMEYER

Para a contagem de esporos em câmara de Neubauer, os esporos foram raspados das placas de Petri e com o auxílio de uma lâmina microscópica foram transferidos para 50 mL de solução salina (0,9% de NaCl e 1 mL de *Tween* 80 a 1%). Após a contagem, alíquotas da suspensão de esporos contendo 10^7 esporos por mL foram inoculadas no meio suplementar (correspondendo a 1% do volume do meio). O cultivo foi realizado em quadruplicata biológica a 28 °C sob agitação (120 rpm) por sete dias em frascos erlenmeyer de 2 litro, contendo 500 mL de meio. Após o cultivo, o meio foi filtrado à vácuo em funil de Büchener com papel filtro *Whatman* nº 5. O material filtrado, denominado extrato bruto, e contendo enzimas secretadas pelo fungo, foi coletado (com adição de azida sódica na concentração de 0,02%) e armazenado em câmara fria (4°C).

MEIO DE CULTURA

A fim de avaliar a influência de diferentes meios de cultura na produção de mananases foram testados três meios distintos: Meio Mínimo suplementado, meio de Mandels & Weber e meio Elementos Traços (TLE); os componentes desses meios estão resumidos nas tabelas 2, 3 e 4 respectivamente. Os dados de atividades enzimáticas obtidos nas culturas foram analisados pelo o método de análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Past3 (*Palaeontological Statistics*, software estatístico desenvolvido por Oyvind Hammer, da Universidade de Oslo, Noruega) para verificar se existem diferenças significativas entre as medias e se as composições dos meios exercem influencias na atividade registrada.

Tabela 2. Composição do meio mínimo suplementado.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	7,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de Levedura	0,6

Tabela 3. Composição do meio Mandels & Weber.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Bacto Peptona	1,0
Uréia	0,3
KH ₂ PO ₄	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
CaCl ₂	0,3
Glicose	5,0
Solução de elementos-traço	1 mL

Solução elementos traços	
Ácido Cítrico	5,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,0
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	1,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
H ₃ BO ₃	0,05
NaNO ₃	0,05

Tabela 4. Composição do meio TLE.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4
Extrato de Levedura	0,6
CaCl ₂ .H ₂ O	0,3
Elementos traços	
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 mg/mL
MnSO ₄ .H ₂ O	1,6 mg/mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4 mg/mL
CoCl ₂	2,0 mg/mL
Tween-80	1,0 mg/mL
Peptona	1,0 g/L

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONCENTRAÇÃO
PROTEÍCA

Os extratos brutos das culturas foram concentrados utilizando o sistema de ultrafiltração do tipo Amicon com membranas de retenção de 30 kDa (PM 30 Milipore Co. Ma. EUA), pressão de 5 kg. f/cm² e temperatura de 4° C. Foram realizados microensaios em triplicata para a determinação das atividades enzimáticas de mananase, xilanase, CMCase e pectinase. A mistura de reação, contendo 5 µL da solução enzimática ou extrato e 10 µL do substrato, foi incubada por 30 min a 50 °C (Ferreira-Filho, Puls e Coughlan 1993 com modificações). Após o tempo de incubação, o ensaio enzimático foi interrompido através da adição de 30 µL de ácido 3,5-Dinitro-Salicílico (DNS) e posterior incubação por 10 min a 97 °C (Miller 1959). Em seguida, 150 µL de água destilada foram adicionados às amostras e realizada a leitura a 540 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices Co., EUA). Para o branco da enzima, o substrato foi substituído por água destilada; em contrapartida, para o branco do substrato a enzima foi substituída por água destilada. As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL de solução enzimática, sendo UI definido como a quantidade de açúcar redutor (µmol) liberado por minuto.

Para a determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos, foram construídas curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as cadeias principais dos polissacarídeos utilizados. Soluções estoques (2 mg/mL) foram utilizados para cada açúcar redutor (glicose, manose, xilose e ácido galacturônico) variando a concentração final do açúcar redutor (0,1 mg/mL-1,4 mg/mL) com um volume final de 15 µL. Após a adição do açúcar redutor, água destilada e DNS, a mistura de reação foi incubada a 97 °C e, subsequentemente, 150 µL de água destilada foram adicionados na mistura de reação para a leitura a 540 nm no espectrofotômetro. A determinação da quantidade de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford 1976), utilizando o kit *Protein assay* (Bio-Rad *Laboratories*, EUA).

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MANANASES

EFEITO DA TEMPERATURA E pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MANANASE

O efeito da temperatura na atividade de mananase foi avaliado por incubação das enzimas no extrato bruto em um intervalo de temperatura de 30 a 80 °C ($\Delta = 0,5^\circ \text{C}$), por meio de microensaios enzimáticos. Para a determinação do efeito do pH na atividade das mananases, a manana 1% foi tamponada com tampão universal a 50 mM (glicina, fosfato

e citrato) em uma ampla faixa de pH (3,5-9,0); em seguida foram realizados microensaios enzimáticos. Para o preparo do tampão, cada solução é feita separadamente a 1 M. E posteriormente são misturadas iguais proporções na molaridade referida, ajustando o pH com HCl ou NaCl.

A fim de avaliar a estabilidade térmica das mananases, as amostras foram incubadas em tubos de 2 mL, na ausência de substrato, em diferentes temperaturas (40, 50 e 55 °C). A posteriori, foram retiradas alíquotas e determinada a meia vida de mananase, por microensaios enzimáticos realizados em triplicatas.

EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E EDTA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS MANANASES

A influência dos íons metálicos e EDTA na atividade das mananases foi avaliada pela pré-incubação das amostras enzimáticas por 20 min (temperatura ambiente) na presença de diversos compostos em concentrações finais de 1 e 10 mM. Os sais utilizados para o ensaio foram: AgNO₃, CaCl₂, CoCl₂, CuSo, 4FeCl₃, FeSO₄, KCl, MgCl₂, MgSO₄ e ZnSO₄. Como controle, os reagentes foram substituídos por água destilada.

EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MANANASES

O efeito dos compostos fenólicos foi realizado utilizando os seguintes reagentes: vanilina e ácido tânico (dissolvidos em água); ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido p-coumárico e ácido cinâmico (dissolvidos em etanol). As amostras enzimáticas contendo atividade de mananase foram pré-incubadas com os compostos fenólicos na concentração de 1 mg/mL, em temperatura ambiente, por 20 min. Em seguida foram realizados microensaios enzimáticos para a determinação de atividade enzimática. Como controle, os reagentes foram substituídos por água ou etanol 50%. Os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

OTIMIZAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE MANANASES

O potencial de *C. byssicola* em produzir enzimas hemicelulolíticas em vários tipos de resíduos agrícolas foi demonstrado por Rocha et al. (2017), nos quais foram utilizadas seis fontes de carbono (casca de maracujá, casca de soja, casca de laranja, piolho de algodão, engaço de bananeira, e bagaço de cana de açúcar). As maiores atividades de mananase foram obtidas em meios contendo casca de soja e bagaço de cana de açúcar. Em continuidade com o estudo do perfil da secreção enzimática de *C. byssicola* em meio suplementado com casca de soja como fonte de carbono, Sciuto (2017) mostrou que no sétimo dia de cultivo o fungo apresentou maior atividade enzimática de mananase. Sabido da potencialidade do fungo em secretar uma diversidade de enzimas hemicelulósicas quando crescido em meio contendo casca de soja, foi decidido avaliar a indução de enzimas mananases por meio de duas abordagens distintas de pré-tratamento hidrotérmico. A primeira metodologia aplicada (condição 1, Figura 11) é considerada como pré-tratamento brando para diminuir a recalcitrância do substrato lignocelulósico pois a temperatura máxima utilizada durante a autoclavagem do material é de 120m°C. Neste tipo de pré-tratamento espera-se apenas uma biomassa mais susceptível a hidrólise enzimática, pois há um afrouxamento do material lignocelulósico. Já na segunda condição (Figura 12), foi utilizada um pré-tratamento denominado *Liquid Hot Water* (pré-tratamento com água quente) caracterizado por solubilizar grande parte da hemicelulose sob altas temperaturas que variam entre 140 a 240 °C, gerando licores ricos em componentes hemicelulósicos (Li et al. 2017a; Silva et al 2019).

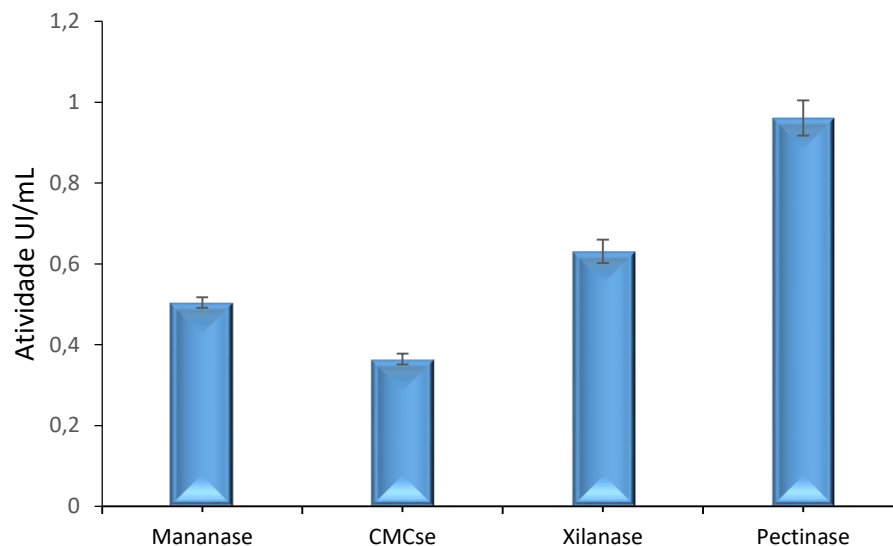


Figura 11. Indução de enzimas secretadas por *Clonostachys byssicola* na condição 1 do pré-tratamento. Anova one way $p=3,005 \times 10^{-7}$. Nessa abordagem a casca do grão de soja foi submetido ao pré-tratamento hidrotérmico durante o tempo de 2 horas sob 120 °C em autoclave

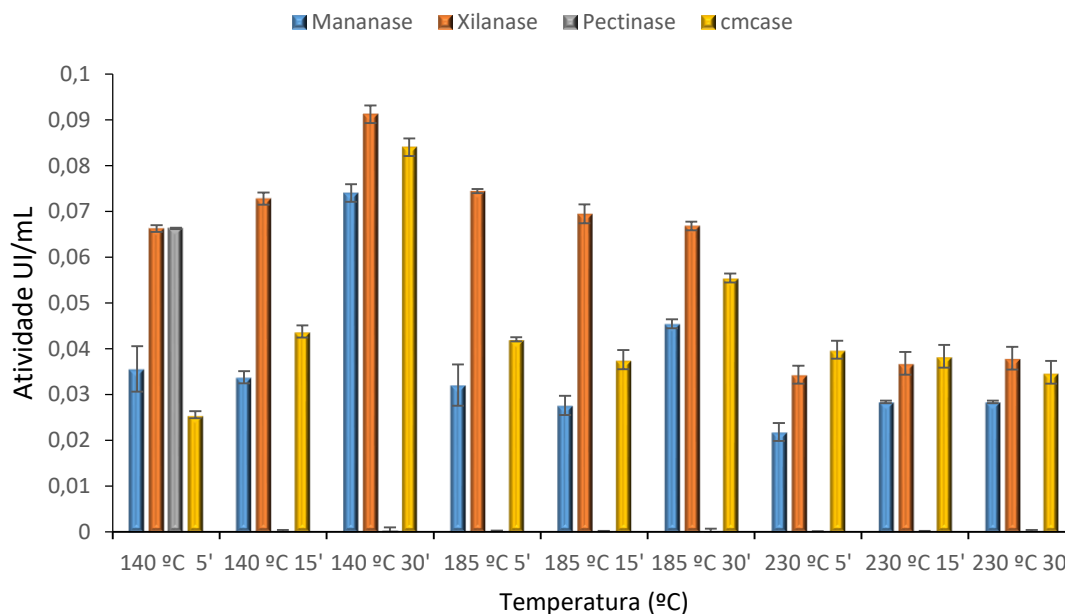


Figura 12. Indução de enzimas secretadas por *Clonostachys byssicola* na condição 2 do pré-tratamento. Nessa abordagem a casca de soja moída foi incubada com água destilada em cilindro de aço inoxidável vedável de volume interno de 300 mL na concentração de 1%, temperaturas variáveis (140, 160 e 230 °C) e tempos de incubação de 5 a 30 min. O Licor resultante do pré-tratamento foi utilizado para o crescimento do fungo.

Quando observamos os resultados obtidos por ambas as condições podemos perceber que o pré-tratamento com água quente (condição 2) não induz nenhuma atividade enzimática em nenhuma condição testada. Os valores obtidos (Figura 12) são

menores que 0,1 UI/mL, em contrapartida, na condição 1 e mais branda de pré-tratamento, atividades de mananase, CMCase, Xilanase e pectinase foram observadas (Figura 11), refletindo a composição da casca do grão de soja. Apesar do pré-tratamento com água quente ser descrito por vários pesquisadores, o estabelecimento de condições ideais para todos os tipos de resíduos lignocelulósicos ainda é um obstáculo a ser contornado. Em 2019 Silva et al., mostraram por meio de estudos de pré-tratamento com água quente que o licor gerado pelo tratamento do bagaço de cana é capaz de induzir enzimas que degradam componentes hemicelulósicos presentes no licor nas temperaturas entre 160 °C a 180 °C e nos tempos de 15 a 30 min. No entanto, por se tratar de resíduos diferentes, provavelmente seriam necessários estudos mais aprofundados para que se possa estabelecer as condições ideais que permitam a solubilização dos componentes hemicelulósicos da casca do grão de soja sem produzir componentes que inativem a atividade enzimática.

A partir dos resultados apresentados nas figuras 11 e 12, a condição 1 de pré-tratamento foi escolhida para prosseguir com os estudos de caracterização das mananases produzidas por *Clonostachys*. Apesar de se tratar de um pré-tratamento que não solubiliza a estrutura hemicelulósica da biomassa, tem-se nesta metodologia a redução da formação de potenciais inibidores. Em continuidade com o processo de otimização da indução de mananases, três meios distintos contendo casca de soja como fonte de carbono foram avaliadas (Figura 13). A observação do gráfico mostra que *C. byssicola* produziu maiores níveis de mananase quando crescido em meio líquido mínimo suplementado, com $p < 0,05$ mostrando a diferença entre os grupos analisados. Por outro lado, níveis reduzidos de atividade foram observados em meio TLE e MW, não havendo diferenças significativas entre eles.

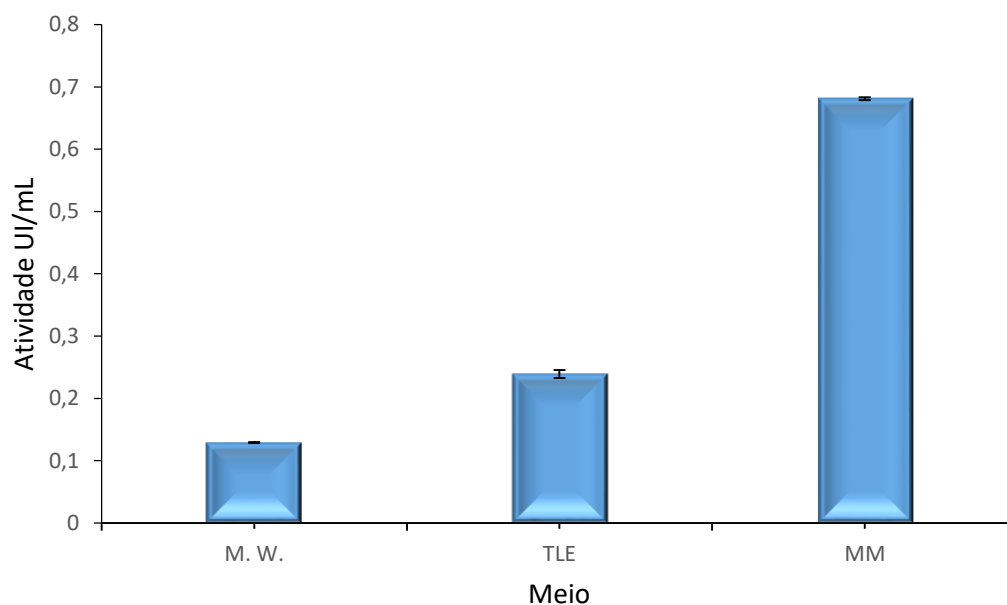


Figura 13. Produção de mananases por *Clonostachys byssicola* cultivado em diferentes meios de cultivo. legenda: M.W (meio mandels & weber); TLE (meio elementos traços); MM (meio mínimo suplementado) Anova one way $p=1,9777e^{-07}$.

Em conformidade com os resultados acima, os estudos prosseguiram com a utilização do MM para a produção de mananases. Seguidamente, foi feito o cultivo de *C. byssicola* durante o período de sete dias produzindo mananases com atividade de 0,43 UI/mL. Estes resultados corroboram com pesquisas realizadas por Corrêa (2016), em que a hidrólise da casca de soja realizada por *Aspergillus terreus* induziu a produção de mananases. Nesse estudo a atividade de mananase alcançou o seu valor máximo no terceiro dia de cultivo (0,5 UI/mL). Ademais, Marco et al. (2015), demonstrou que o cultivo do fungo *A. foetidus* em meio submerso contendo casca de soja como fonte de carbono, apresentou maior atividade de mananase (0,94 UI/mL) em relação ao resíduos da colheita de soja (atividade inferior a 0,1 UI/mL).

A conversão microbiana da casca de soja em açúcares fermentescíveis ou oligossacarídeos ainda é pouco explorada, contudo a investigação de novas linhagens fúngicas e diferentes abordagens de produção enzimática tem mostrado que a composição química da casca de soja é responsável por induzir um expressivo arsenal enzimático; propriedade que pode ser observada neste trabalho. Igualmente Mäkelä e colaboradores (2017), analisaram o secretoma de *Podospora anserina* e confirmaram a presença de um *mix* de celulasas, hemicelulasas (com predominância de mananases), enzimas oxidativas (AA9) e outras enzimas. No desfecho do seu trabalho, Mäkelä pode concluir que o

coquetel enzimático proveniente da casca de soja mostrou capacidade superior na liberação de açúcares redutores em relação à casca de algodão e palha de trigo pré-tratada com ácido.

Além de mananases produzidas em meio submerso, Montibeller (2015), otimizou as condições fermentativas para a produção dessas enzimas por meio da técnica de fermentação no estado semi-sólido (FESS), com detecção de 30,02 UI/mL de atividade. A técnica é uma mistura do cultivo em meio submerso e sólido, sendo uma alternativa para escalonamento de processos com o emprego de biorreatores. A produção de outros tipos de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a casca de soja também pode ser encontrada em pesquisas realizadas por outros autores (Coffman, Li e Ju (2014), Li et al. (2017)), mostrando a produção de altos níveis de celulases, xilanases, pectinase, α -galactosidases e poligalacturonases.

ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração é um processo que separa, seletivamente, macromoléculas com peso molecular de 1 a 200 kDa de solventes e solutos dissolvidos (Mistry e Maubois 2017), na qual devido a diferença de pressão aplicada, as moléculas com massa molecular inferior ao corte da membrana permeiam através dos poros definidos. Em contrapartida, partículas maiores como as proteínas são retidas (Rodrigues et al. 2003). Após o cultivo, durante o período de sete dias, o extrato bruto foi submetido à ultrafiltração com uma membrana de celulose regenerada com um ponto de corte de 30 kDa, devido a maioria das mananases de fungos descritas apresentam tamanho molecular maior que esse valor. A atividade enzimática foi examinada nas duas frações: concentrada e ultrafiltrada. A maior parte da atividade de mananase (60,8 %) foi encontrada na fração concentrada (Figura 14, e Tabela 5), o que corrobora a efetividade do processo. Com exceção da xilanase, em que grande parte da atividade é notada em ambas as frações, as demais atividades (Mananase, CMCase e Pectinase) ficaram retidas na fração concentrada. A fração concentrada foi escolhida para realização dos estudos posteriores.

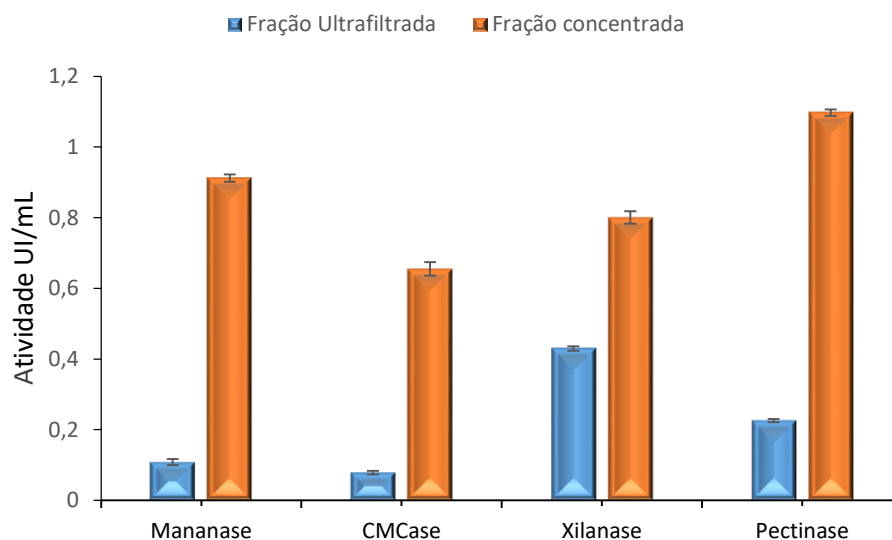


Figura 14. Perfil de holocelulases produzidas por *C. byssicola* após a etapa de ultrafiltração em membrana com ponto de corte de 30 kDa.

Tabela 5. Valores de atividade de mananases obtidos após a ultrafiltração do extrato bruto de *C. byssicola*.

Volume (mL)	Amostra	Atividade mananase (UI/mL)	Atividade mananase total	Recuperação da atividade mananase (%)
1220	Extrato bruto	0,43	481,6 U.I	100
244	Concentrado	1,2	292,8 U.I	60,8
976	Ultrafiltrado	0,10	97,6 U.I	20,3

A ultrafiltração tem sido empregada como importante ferramenta para concentração de enzimas com alta recuperação de atividade (60,8 % nosso caso), como também pode ser utilizada na clarificação de amostras. Por isso, é utilizada, na maioria dos estudos, como etapa inicial de purificação e tem se mostrado uma ferramenta bem estabelecida em muitos processos industriais (Polleto 2015).

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

EFEITO DA TEMPERATURA E pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS MANANASES

A influência da temperatura e pH na atividade das enzimas é fundamental para

muitos processos biotecnológicos (Roy et al. 2010). Os efeitos da temperatura e o pH sobre a atividade de mananases do extrato bruto são demonstrados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. A amostra de mananase do extrato bruto concentrado apresentou maior atividade quando incubada a 50 °C, com diferença significativa entre as demais temperaturas ($p > 0,05$ dados não mostrados), tendo uma diminuição da sua atividade em temperaturas maiores que 60 °C. Mananases microbianas são ativas em diferentes temperaturas que variam no intervalo de 37-70 °C (Chauhan et al. 2012). Estudos acerca dos efeitos da temperatura na atividade enzimática mostram que as diferenças entre as formas inativa e ativa se dá no sítio ativo da enzima, uma vez que a desnaturação proteica precede a inativação do sítio ativo (Roy et al. 2010).

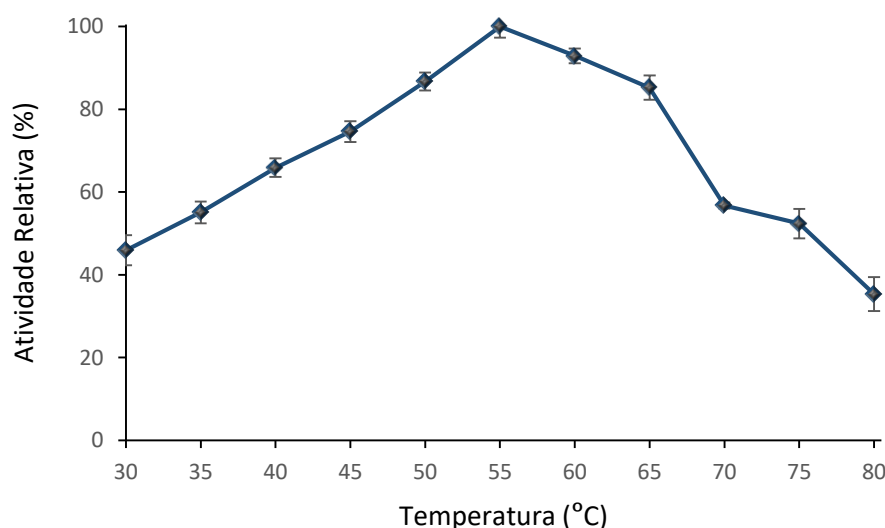


Figura 15. Efeito da temperatura na atividade das mananases do extrato bruto concentrado (EBC).

Quando incubada em diferentes faixas de pH, a atividade das mananases do EBC não mostraram uma diferença significativa entre os pHs 3,5-4,0 e 6,5-9,0 ($p > 0,05$). A análise do test Turkey's (dados não mostrados) evidenciou que há diferenças estatísticas entre o pH 5,0/5,5 e 5,0/6,0, dados que corroboram com a Figura 16, no qual a atividade relativa de mananase alcança o valor máximo (100%) no pH 5,0 tendo uma redução da sua atividade em pH básico. Os resultados encontrados para mananases do EBC são similares às características de outras enzimas fúngicas que degradam manana (tabela 3). A maior atividade de mananases tem sido relatada em pH ácido para maioria dos fungos filamentosos e no intervalo de 50-80°C (Tabela 6). O perfil de atividade de mananases do EBC produzidas por *C. byssicola*, demonstra que essas enzimas apresentam grande

potencial de aplicação nas indústrias de rações de animais e de extração de café, visto que são necessárias enzimas que atuem em pH ácido para a eficiente hidrólise de heteromananas, como também enzimas que sejam resistentes a proteases digestivas, como pepsina e tripsina quando são utilizadas como aditivos na ração animal (Chauhan et al. 2012).

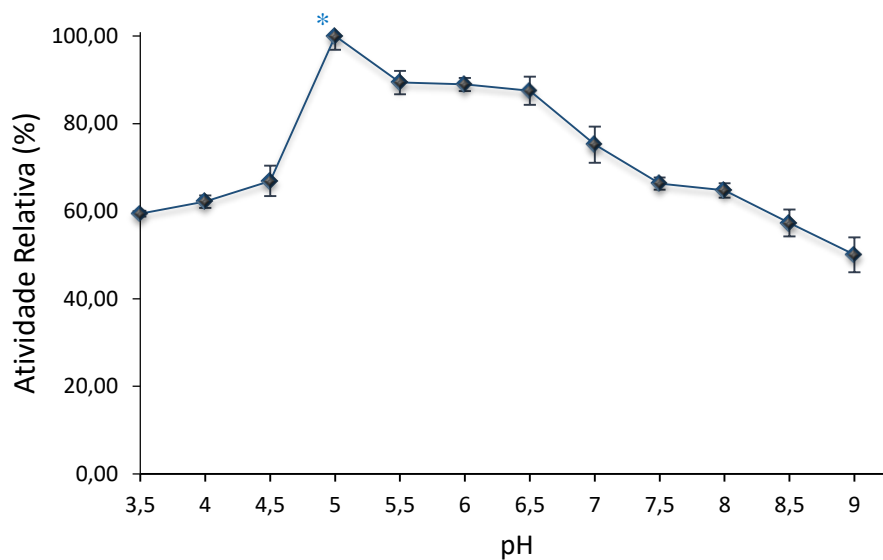


Figura 16. Efeito do pH na atividade da mananase do EBC em tampão glicina, fosfato e citrato ($p > 0,05$).

Tabela 6. Efeito do pH e temperatura na atividade de mananases descritas para diferentes fungos

Organismo	pH ótimo	Temperatura ótima	Peso molecular	Referência
<i>Clonostachys byssicola</i>	5.0	55 °C	40-50 kDa	Este trabalho
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4.5	65 °C	60 kDa	(Purchart et al. 2004)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4.5	65 °C	63 kDa	(Purchart et al. 2004)
<i>Orpinomyces</i> sp.	6.0	50 °C	55 kDa	(Ximenes et al. 2005)
<i>Aspergillus sulphureus</i>	2.5	50 °C	41.38 kDa	(Chen et al. 2007)
<i>Bispora</i> sp. MEY-I	1	65 °C	46.8 kDa	(Luo et al. 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	5.5	30 °C	-	(Adesina, Oluboyede e Onilude 2013)
<i>Aspergillus nidulans</i>	5.0	80 °C	63 kDa	(Lu et al. 2014)
<i>Penicillium oxalicum</i>	4.0	80 °C	61.6 kDa	(Liao et al. 2014)
<i>Aspergillus nidulans</i>	4.0	50 °C	-	(Shimizu et al. 2015)
<i>Aspergillus niger</i>	4.5	80 °C	45 kDa	(Yu et al. 2015)
<i>Neosartorya fischeri</i>	4.0	80 °C	43 kDa	(Yang et al. 2015)
<i>Aspergillus nidulans</i>	5.5	80 °C	35.2 kDa	(Freiesleben et al. 2016)
<i>Trichoderma reesei</i>	3.5	-	45.2 kDa	(Freiesleben et al. 2016)
<i>Aspergillus terreus</i>	7.0	70 °C	49 kDa	(Soni et al. 2016)
<i>Lichtheimia ramosa</i>	5.0	65 °C	40 kDa	(Xie et al. 2020)
<i>Talaromyces cellulolyticus</i>	4.5	60 °C	55.3 kDa	(Uechi et al. 2020)
<i>Aspergillus niger</i>	4.0	60 °C	47,4 kDa	(Penido et al. 2020)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	4.6	60 °C	42.1 kDa	(Ma et al. 2021)
<i>Aspergillus niger</i>	5.0	45 °C	65 kDa	(Wang et al. 2021)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6.0	60 °C	40 kDa	(Gu et al. 2021a)

EFEITO DE ÍONS E EDTA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS MANANASES

Na natureza, as enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica estão, provavelmente, em contato com diversos íons metálicos. Esses íons são responsáveis por afetarem a atividade de enzimas no processo de degradação da biomassa (Tejirian e Xu

2010), como também podem impedir a ligação não produtiva entre a enzima e a lignina (Vasconcellos et al. 2016). As enzimas que necessitam desses componentes químicos adicionais (mais precisamente denominados cofatores) são ativadas ou inativadas pela interação, geralmente não covalente de íons inorgânicos (Jaramillo 2014). O efeito de íons e EDTA na atividade das mananases do EBC são demonstrados na Figura 17. A atividade foi inibida parcialmente (até 70-80%) pela Ag^+ , Ca^{2+} e Cu^{2+} na concentração final de 1mM. No entanto, maiores efeitos inibitórios foram observados na concentração de 10 mM pelos íons Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ e o agente quelante EDTA. Os íons Mg^{2+} quase não mostraram efeito inibitório mesmo a concentrações de 10 mM. Curiosamente, o efeito inibitório do Ca^{2+} desapareceu na concentração de 10 mM (Figura 17). Dentre todos os íons analisados apenas o Co^{2+} na concentração de 10 mM foi capaz de ativar a mananase (aumento de 15%), no entanto as análises estatísticas mostraram que o aumento da atividade das mananases não foi significativo quando comparado com o controle e em relação a concentração de 1 mM ($p > 0,05$).

Como parte da caracterização de enzimas, íons metais divalentes, (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) trivalentes, (Fe^{3+}) e monovalentes (Na^+ , K^+) são frequentemente testados para o seu efeito na atividade enzimática (Tejirian e Xu 2010). Apesar de mananases de *C. byssicola* não necessitarem de cofatores para o aumento de sua atividade, alguns estudos têm evidenciado o efeito ativador do íon Co^{2+} na concentração de 10 mM para diversos tipos de mananases. A tabela 7 mostra que para outros fungos esse íon atua como ativador de diferentes tipos de mananases, estando raramente agindo como inibidor dessas enzimas. No entanto, ao analisarmos a Tabela 7 podemos perceber que o íon Cu^{2+} , Ag^+ e Fe^{2+} atuam como inibidores para a maioria das enzimas apresentadas.

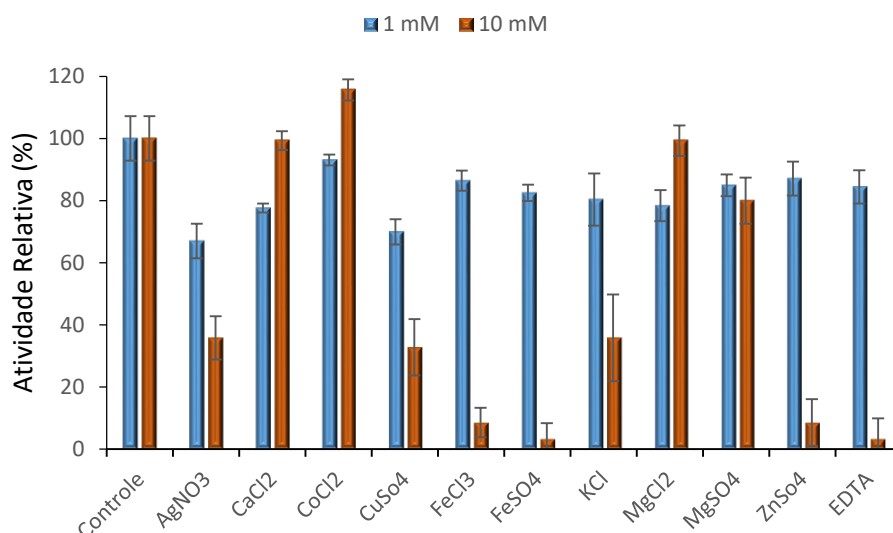


Figura 17. Efeito de íons metálico e EDTA na atividade da mananases do EBC.

Tabela 7. Efeito de íons e EDTA na atividade de mananases de diversos fungos.

[] mM	Ativador	Inibidor	Referência
1	Co ²⁺ , Fe ³⁺	Ca ²⁺	(Srivastava, <i>et al.</i> , 2017).
5	Mn ²⁺ , Zn ²⁺	Fe ³⁺	(Sakai <i>et al.</i> 2017)
5	Cu ²⁺ , K ⁺	-	(Jana <i>et al.</i> 2018)
5	K ⁺	Ag ⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺	(Gu <i>et al.</i> 2021b)
5	Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺	K ⁺ , Zn ²⁺	(Xie <i>et al.</i> 2020)
5	Mg ²⁺	Fe ³⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺	(Liu <i>et al.</i> 2020c)
1	-	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Fe ³⁺	(Penido <i>et al.</i> 2020)
1	Zn ²⁺	K ⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺	(Chen <i>et al.</i> 2021)
1	Co ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺	K ⁺ , Ca ²⁺	(Karahalil <i>et al.</i> 2020)

EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS MANANASES

Nas plantas, grande parte dos compostos fenólicos são encontrados na estrutura da lignina, Contudo, algumas moléculas fenólicas são produzidas pelas plantas e podem inibir a atividade enzimática de patógenos em concentrações que variam de μM a mM (Ximenes *et al.* 2010). Durante o pré-tratamento, a despolimerização parcial da lignina é responsável por liberar compostos fenólicos simples ou oligoméricos com uma estrutura condensada e heterogênea que pode afetar a catálise enzimática de forma mais severa do

que a lignina isolada não-pretratada. A formação desses compostos depende do tipo de matéria prima utilizada e da severidade do pré-tratamento (Kim 2018). Os resultados da avaliação da influência dos compostos fenólicos na atividade das mananases do EBC, quando incubados em uma concentração final de 1 mg/mL é apresentado na tabela 8. Os resultados mostram que em todos os casos há uma diminuição da atividade enzimática das mananases, nos quais o ácido-p-coumárico, ácido 4-hidróxi-benzóico, e o ácido cinâmico inibiram mais fortemente a atividade das enzimas do EBC (com uma redução entre 39 e 44% da atividade de mananase).

O efeito inibitório dos compostos fenólicos na atividade enzimática ainda é um desafio para a utilização dos resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono para a produção de enzimas. A natureza da lignina difere dependendo do tipo de biomassa e o conhecimento sobre o mecanismo de inibição enzimática pelas moléculas derivadas da lignina não tem sido totalmente esclarecido. Sabe-se que uma das formas de inibição é por meio de precipitação ou agregação irreversíveis das proteínas, ou pela interação de moléculas fenólicas com os resíduos aromáticos encontrados na estrutura proteica de algumas enzimas (Qin et al. 2016; Tian, Jiang e Ou 2013).

Tabela 8. Efeito de compostos fenólicos na atividade de mananase.

EBC	Atividade Relativa (%)
<i>Controle</i>	100 ± 2,7
<i>Vanilina</i>	78,15273 ± 1,1
<i>Ácido tânico</i>	68,66232 ± 3,6
<i>Ácido p-coumárico</i>	58,2603 ± 4,1
<i>Ácido cinâmico</i>	56,55707 ± 2,3
<i>Ácido ferílico</i>	80,22051 ± 2,0
<i>Ácido 4-hidróxi-benzóico</i>	61,20603 ± 1,8

TERMOESTABILIDADE

Aliado às propriedades de pH, temperatura e da presença de componentes químicos, a estabilidade enzimática é outra propriedade que pode contribuir para as

potencialidades de uso na diversidade de processos industriais já existentes (Sharma et al. 2019). O estudo da termoestabilidade pode auxiliar no entendimento sobre a relação entre a estrutura e a função das enzimas. A estabilidade enzimática por longos períodos é uma importante característica para a seleção de mananases (Gummadi e Panda 2003). A fim de avaliar a meia vida das mananases contidas no EBC, foram realizados ensaios de termoestabilidade cujos resultados são mostrados na Figura 18. A meia vida de uma enzima pode ser definida como o tempo necessário para que a atividade enzimática decresça à metade da sua atividade original (Griffin, et al., 1984 apud Sciuto 2015). As mananases presente no extrato bruto concentrado foram incubadas em três temperaturas distintas: 40, 50, e 55°C. Como esperado, a estabilidade das mananases do EBC reduziu com o aumento da temperatura, no qual a 40 °C a atividade de mananases permaneceu estável após 96 horas de incubação, chegando próximo a metade da atividade máxima $\approx 60\%$, no tempo de 192 horas (8 dias). Quando incubada à 50 °C, a meia vida da enzima foi de apenas 3 horas. Contudo, valores menores de meia vida foram alcançados no momento em que o EBC foi incubado a 55°C, exibindo apenas 20 minutos de termoestabilidade.

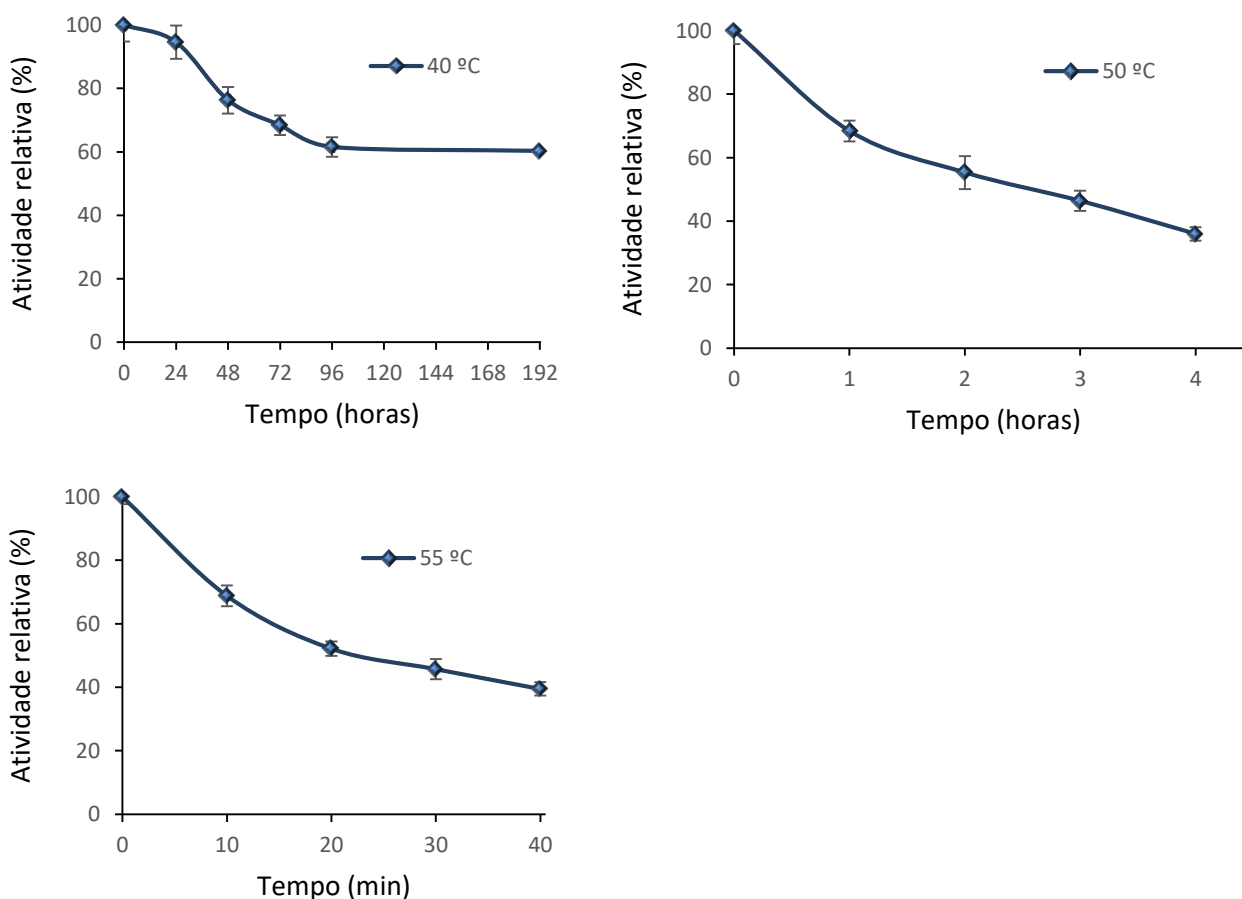


Figura 18. Determinação da termoestabilidade das mananases do EBC a 40, 50 e 55 °C.

Um aspecto importante a ser destacado ao longo da caracterização enzimática é o efeito diferencial entre o valor da temperatura ótima e a temperatura com maior termoestabilidade. Os resultados obtidos mostram que as condições de temperatura onde as mananases do EBC são mais ativas não são ideais para a maior termoestabilidade como já foi indicado em estudos enzimáticos (Gummadi and Panda 2003). A respeito da baixa estabilidade enzimática Lu et al. (2013), descreveram uma relação direta entre os tempos menores de termoestabilidade e a ausência do substrato, o qual pode estar sugerindo um papel estabilizante do substrato sobre a enzima no complexo catalítico.

Experimentos realizados por Srivastava e Kapoor (2017) mostraram que o aumento da termoestabilidade das enzimas pode ser explicado pela ligação de íons no sítio catalítico e pela presença de módulos de ligação ao carboidrato (CBMs). Visto que o íon cobalto é capaz de ativar as mananases de diferentes fungos, análises de termoestabilidade, utilizando este íon na concentração final de 10 Mm foram realizadas. Na Figura 19, podemos observar que a inclusão do íon Co^{2+} no ensaio de termoestabilidade não modifica o padrão de diminuição da atividade no tempo, mas sim reduziu a meia vida pela metade, de 4h para 2h.

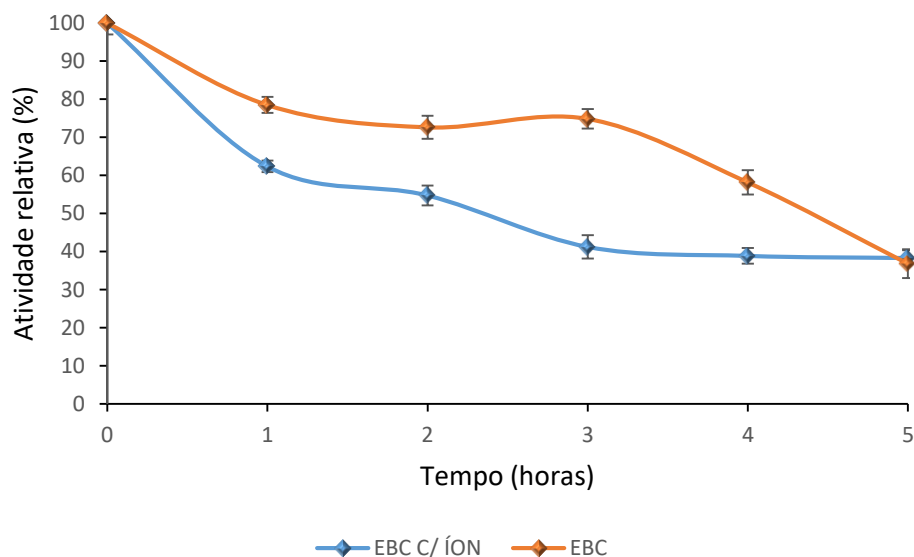


Figura 19. Avaliação da termoestabilidade do EBC na presença do íon cobalto quando incubado na temperatura de 50 °C.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As características encontradas para as mananases produzidas por *C. byssicola*, são de grande importância para a realização de experimentos adicionais que visam a identificação e a compreensão de como essas enzimas atuam no processo de hidrólise de diferentes substratos. A produção de diferentes tipos de glicosil hidrolases pelo fungo, evidenciou a capacidade que *C. byssicola* tem de se adaptar em fontes de carbonos mais complexas, como a casca do grão de soja para a secreção de holocelulases, constituídas principalmente por enzimas que degradam componentes hemicelulósicos da parede celular vegetal. A necessidade de se explorar espécies que ainda não são bem descritas pela literatura é uma forma de agregar maiores interesses em fungos provenientes do cerrado brasileiro. Além do mais, a utilização dessas enzimas como ferramentas para diversos tipos de aplicações industriais é uma forma de revelar o potencial de *C. byssicola* como microrganismo promissor em processos de biorrefinaria.

A partir dos resultados do capítulo apresentado anteriormente, podemos concluir que:

1.- O cultivo de *Clonostachys byssicola* em meio contendo a casca de soja como fonte de carbono induziu a produção de diferentes enzimas holocelulolíticas, dentro das quais estão as mananases.

2.- As mananases presentes no extrato bruto concentrado de *C. byssicola* possuem temperatura ótima de 55 °C e uma estabilidade térmica a 40°C que garante 60% da atividade inicial por mais de 96 h de incubação. Esta característica molecular as torna promissoras para aplicações de biorremediação industrial.

3.- As mananases do extrato bruto concentrado de *C. byssicola* tem uma faixa de pH ótimo entre 5 e 6,5 ligeiramente superior ao resto das mananases microbianas descritas.

4.- As mananases do extrato bruto concentrado de *C. byssicola* não requerem cofatores iônicos para sua atividade, como esperado, diferentes compostos fenólicos tem efeitos inibitórios.

O próximo capítulo tem por objetivo estudar o potencial das enzimas do EBC na sacarificação de substratos lignocelulósicos e substratos comerciais. Sabido das condições ideais de temperatura e pH para a manutenção da atividade de mananases produzidas por *Clonostachys byssicola*, abordagens contemplando as características evidenciadas neste capítulo serão consideradas, a fim de alcançar rendimentos máximos de hidrólise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesina FC, Oluboyede OA, Onilude AA (2013) Production , purification and characterisation of a β - mannanase by *Aspergillus niger* through solid state fermentation (SSF) of *Gmelina arborea* shavings. *J Microbiol Res* 7:282–289 . doi: 10.5897/AJMR11.1106
- Anderson CT (2015) We be jammin ' : an update on pectin biosynthesis , trafficking and dynamics. *J Exp Bot* 67:495–502 . doi: 10.1093/jxb/erv501
- Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D (2013) Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 64:747–749 . doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105534
- Badhan AK, Chadha BS, Kaur J, Saini HS, Bhat MK (2007) Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresour Technol* 98:504–510 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.009
- Barcelos MCS, Ramos CL, Kuddus M, Rodriguez-Couto S, Srivastava N, Ramteke PW, Mishra PK, Molina G (2020) Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. *Biotechnol Lett* 42:1799–1827 . doi: 10.1007/s10529-020-02957-3
- Benocci T, Victoria M, Pontes A, Zhou M, Seiboth B, Vries RP De (2017) Biotechnology for Biofuels Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels* 10:1–25 . doi: 10.1186/s13068-017-0841-x
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99 . doi: 10.1002/elps.1150080203
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Broberg M, Dubey M, Sun MH, Ihrmark K, Schroers HJ, Li SD, Jensen DF, Durling MB, Karlsson M (2018) Out in the cold: Identification of genomic regions associated with cold tolerance in the biocontrol fungus *clonostachys rosea* through genome-wide association mapping. *Front Microbiol* 9:1–13 . doi: 10.3389/fmicb.2018.02844
- Buckeridge MS (2018) The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. *Biosystems* 164:112–120 . doi: 10.1016/j.biosystems.2017.10.003
- Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure , function , and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Res* 344:1879–1900 . doi: 10.1016/j.carres.2009.05.021
- Cain JA, Solis N, Cordwell SJ (2014) Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics* 97:265–286 . doi: 10.1016/j.jprot.2013.08.012
- Canteri MHG, Moreno L, Wosiack G, Scheer AP (2011) Pectina : da Matéria-Prima ao Produto Final. *Polímeros* 22:149–157 . doi: 10.1590/S0104-14282012005000024.
- Cassales A, de Souza-Cruz PB, Rech R, Záchia Ayub MA (2011) Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. *Biomass and Bioenergy* 35:4675–4683 . doi: 10.1016/j.biombioe.2011.09.021
- Chambers MC, MacLean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, Gatto L, Fischer B, Pratt B, Egertson J, Hoff K, Kessner D, Tasman N, Shulman N, Frewen B, Baker TA, Brusniak MY, Paulse C, Creasy D, Flashner L, Kani K, Moulding C, Seymour SL, Nuwaysir LM, Lefebvre B, Kuhlmann F, Roark J, Rainer P, Detlev S, Hemenway T, Huhmer A,

- Langridge J, Connolly B, Chadick T, Holly K, Eckels J, Deutsch EW, Moritz RL, Katz JE, Agus DB, MacCoss M, Tabb DL, Mallick P (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* 30:918–920 . doi: 10.1038/nbt.2377
- Chatterton S, Punja ZK (2009) Chitinase and β -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian J Microbiol* 55:356–367 . doi: 10.1139/W08-156
- Chauhan PS, Gupta N (2017) Insight into microbial mannosidases: a review. *Crit Rev Biotechnol* 37:190–201 . doi: 10.3109/07388551.2015.1128878
- Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N (2012) Mannanases : microbial sources , production , properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1817–1830 . doi: 10.1007/s00253-012-3887-5
- Chen M, Wang J, Lin L, Wei W, Shen Y, Wei D (2021) High-level expression of a β -mannanase (manB) in *Pichia pastoris* GS115 for mannose production with *Penicillium brevicompactum* fermentation pretreatment of soybean meal. *Bioprocess Biosyst Eng* 44:549–561 . doi: 10.1007/s00449-020-02467-6
- Chen X, Cao Y, Ding Y, Lu W, Li D (2007) Cloning , functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* α -mannanase in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* 128:452–461 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.11.003
- Cherubini F (2010) The biorefinery concept : using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag* 51:1412–1421 . doi: 10.1016/j.enconman.2010.01.015
- Coffman AM, Li Q, Ju L-K (2014) Effect of natural and pretreated soybean hulls on enzyme production by *Trichoderma reesei*. *J Am Oil Chem Soc* 91:1331–1338 . doi: 10.1007/s11746-014-2480-8
- Corrêa CL (2016) Estudo do transcriptoma global do fungo *Aspergillus terreus* quando cultivado em resíduos agroindustriais. Universidade de Brasília
- Cortivo PRD, Hickert LR, Hector R, Ayub MAZ (2018) Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. *Ind Crops Prod* 113:10–18 . doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.010
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850–861 . doi: 10.1038/nrm1746
- Cosgrove DJ (2014) Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr Opin Plant Biol* 22:122–131 . doi: 10.1016/j.pbi.2014.11.001
- de Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS (2013) Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Res* 6:564–579 . doi: 10.1007/s12155-012-9268-1
- Dence AW, Lin SY (1992) General structural features of lignin. In: Timell TE (ed) *Methods in lignin chemistry*. Springer, Berlin, pp 1–17
- Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P (2004) Guar Seed β -Mannan Synthase Is a Member of the Cellulose Synthase Super Gene Family. *Science* (80-) 303:363–366 . doi: 10.1126/science.1090908

- Dionísio M, Grenha A (2012) Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *J Pharm Bioallied Sci* 4:175–185 . doi: 10.4103/0975-7406.99013
- Doherty WOS, Mousavioun P, Fellows CM (2011) Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind Crops Prod* 33:259–276 . doi: 10.1016/j.indcrop.2010.10.022
- Dunn MJ (2004) *Electroelution of proteins from polyacrylamide gels.*, Second Edi. Humana Press, Totowa
- Ferreira-Filho EX, Puls J, Coughlan MP (1993) Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *J Ind Microbiol* 11:171–180 . doi: 10.1007/BF01583719
- Florencio C, Colli A, Farinas S (2017) Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Quim Nova* 40:1082–1093 . doi: 10.21577/0100-4042.20170104
- Frazzetto G (2003) White biotechnology. *Sci Soc* 4:835–837 . doi: 10.1038/sj.embor.embor928
- Freiesleben P V, Spodsberg N, Blicher TH, Anderson L, Jorgensen H, Stalbrand H, Meyer AS, Krogh KBRM (2016) An *Aspergillus nidulans* GH26 endo- β -mannanase with a novel degradation pattern on highly substituted galactomannans. *Enzyme Microb Technol* 83:68–77
- Fry SC (2017) Plant Cell Wall Polymers. In: Love J, Bryant JA (eds) *Biofuels and bioenergy*, 1st edn. John Wiley & Sons, pp 59–87
- Gomes HAR, Moreira LRS, Júnior ACS, Fontes W, Santana RH, Kruger RH, Valle de Sousa M, Ricart CAO, Ferreira-Filho EX (2020) Evaluation of different secretomes produced by *Clonostachys bysicola* as tools to holocellulose breakdown. *Int Biodeterior Biodegrad* 148:104880 . doi: 10.1016/j.ibiod.2019.104880
- Gu X, Lu H, Chen W, Meng X (2021a) Characterization of a novel thermophilic mannanase and synergistic hydrolysis of galactomannan combined with swollenin. *Catalysts* 11:1–11 . doi: 10.3390/catal11020254
- Gu X, Lu H, Zhang L, Meng X (2021b) A Thermophilic GH5 Endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and Its synergistic hydrolysis of mannan-containing polysaccharides. *Catalysts* 11:2–13 . doi: 10.3390/catal11070862
- Gummadi SN, Panda T (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases * a review. *Process Biochem* 38:987–996
- Guruprasad K, Reddy BVB, Pandit MW (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng Des Sel* 4:155–161 . doi: 10.1093/protein/4.2.155
- Hilge M, Gloor S, Winterhalter K, Zimmermann W, Piontek K (1996) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of two β -mannanase isoforms from *Thermomonospora fasca* KW3. *Acta Crystallogr* 52:1224–1225 . doi: 10.1107/S0907444996009006
- Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* (80-) 315:804–807 . doi: 10.1126/science.1137016
- Huang, Yao-Bing fu Y (2013) Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chem* 15:1095–1111 . doi: 10.1039/c3gc40136g

- Jana UK, Suryawanshi RK, Prajapati BP, Soni H, Kango N (2018) Production optimization and characterization of manno oligosaccharide generating B-mannanase from *Aspergillus oryzae*. *Bioresour Technol* 268:308–314 . doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.143
- Jaramillo PMD (2014) Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo. Universidade de Brasília
- Johnson LA, White PJ, Galloway R (2008) Soybeans: chemistry, production, processing and utilization, 1st edn. AOCS Press
- Jong E de, Jungmeier G (2015) Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In: Pandey A, Höfer R, Taherzadeh M, Nampoothiri KM, Larroche C (eds) *Industrial biorefineries & white biotechnology*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, p 710
- Kamm B, Kamm M (2004) Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:137–145 . doi: 10.1007/s00253-003-1537-7
- Karahalil E, Germec M, Karaoglan M, Yatmaz E, Coban HB, Inan M, Turhan I (2020) Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. *Biomass Convers Biorefinery* 10:1189–1205 . doi: 10.1007/s13399-019-00487-1
- Karlsson M, Amby DB, Lackner G, Lagopodi AL, Wang J, Kosawang C, Durling MB, Henrissat B, Choi J, Levasseur A, Vannacci G, Kamou N, Panteris E, Tzelepis GD, Zapparata A, Sarrocco S, Nygren K, Collinge DB, Dubey MK, Jensen B, Lee Y-H, Jensen DF, Hoffmeister D, Pöggeler S (2015) Insights on the Evolution of Mycoparasitism from the Genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biol Evol* 7:465–480 . doi: 10.1093/gbe/evu292
- Karp SG, Rozhkova AM, Semenova M V., Osipov DO, de Pauli STZ, Sinitsyna OA, Zorov IN, de Souza Vandenberghe LP, Soccol CR, Sinitsyn AP (2021) Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. *Bioresour Technol* 330:124888 . doi: 10.1016/j.biortech.2021.124888
- Kim D (2018) Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose : Inhibitor Effects and Detoxification Strategies : A Mini Review. *Molecules* 23:2–21 . doi: 10.3390/molecules23020309
- Kou Q, Xun L, Liu X (2016) TopPIC: A software tool for top-down mass spectrometry-based proteoform identification and characterization. *Bioinformatics* 32:3495–3497 . doi: 10.1093/bioinformatics/btw398
- Kubicek CP (2013) The plant biomass. In: Kubicek CP (ed) *Fungi and Lignocellulosic Biomass*, 1st edn. Joh Wiley & Sons, Iowa, pp 1–11
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685 . doi: 10.1038/227680a0
- Lermyte F, Sobott F (2015) Electron transfer dissociation provides higher-order structural information of native and partially unfolded protein complexes. *Proteomics* 15:2813–2822 . doi: 10.1002/pmic.201400516
- Li M, Cao S, Meng X, Studer M, Wyman CE, Ragauskas AJ, Pu Y (2017a) The effect of liquid hot water pretreatment on the chemical-structural alteration and the reduced recalcitrance in poplar. *Biotechnol Biofuels* 10:1–13 . doi: 10.1186/s13068-017-0926-6
- Li M, Yoo CG, Pu Y, Biswal AK, Mohnen D, Ragauskas AJ, Tolbert AK (2019) Downregulation of

- pectin biosynthesis gene GAUT4 leads to reduced ferulate and lignin- carbohydrate cross-linking in switchgrass. *Commun Biol* 2:1–11 . doi: 10.1038/s42003-018-0265-6
- Li Q, Loman A Al, Coffman AM, Ju L-K (2017b) Soybean hull induced production of carbohydrases and protease among *Aspergillus* and their effectiveness in soy flour carbohydrate and protein separation. *J Biotechnol* 248:1–8
- Liao H, Li S, Zheng H, Wei Z, Liu D, Raza W, Shen Q (2014) A new acidophilic thermostable endo-1, 4- β - mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2 : cloning , characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* 14:1–12 . doi: 10.1186/s12896-014-0090-z
- Liu HM, Wang FY, Liu YL (2016) Hot-compressed water extraction of polysaccharides from soy hulls. *Food Chem* 202:104–109 . doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.129
- Liu Y, Lei F, He L, Xu W, Jiang J (2020a) Comparative study on the monosaccharides of three typical galactomannans hydrolyzed by different methods. *Ind Crops Prod* 157: . doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112895
- Liu Z, Ning C, Yuan M, Fu X, Yang S, Wei X, Xiao M, Mou H, Zhu C (2020b) High-efficiency expression of a superior β -mannanase engineered by cooperative substitution method in *Pichia pastoris* and its application in preparation of prebiotic mannoooligosaccharides. *Bioresour Technol* 311:123482 . doi: 10.1016/j.biortech.2020.123482
- Liu Z, Ning C, Yuan M, Yang S, Wei X, Xiao M, Fu X, Zhu C, Mou H (2020c) High-level expression of a thermophilic and acidophilic β -mannanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with significant potential in mannoooligosaccharide preparation. *Bioresour Technol* 295:122257 . doi: 10.1016/j.biortech.2019.122257
- Lu H, Luo H, Shi P, Huang H (2014) A novel thermophilic endo- β -1 , 4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3 : functional roles of carbohydrate-binding module and Thr / Ser-rich linker region. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2155–2163 . doi: 10.1007/s00253-013-5112-6
- Lu H, Luo H, Shi P, Huang H, Meng K, Yan P, Yao B (2013) A novel thermophilic endo- β -1 , 4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3 : functional roles of carbohydrate-binding module and Thr / Ser-rich linker region. *Biotechnol Relev Enzym Proteins* 98:2155–2163 . doi: 10.1007/s00253-013-5112-6
- Luo H, Wang Y, Wang H, Yang J, Yang Y, Huang H, Yang P, Bai Y, Shi P, Fan Y, Yao B (2009) A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: Gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:453–461 . doi: 10.1007/s00253-008-1766-x
- Ma L, Jiang H, Li W, Qin H, Lv Z, Huang J, Hou X, Wang W (2021) Biochemical properties of a native β -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus* QH1 and partial characterization of its N-glycosylation. *Biochem Biophys Reports* 26:100922 . doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100922
- Macgregor EA (2005) An overview of clan GH-H and distantly-related families. *Biologia (Bratisl)* 16:5–12
- Mäkelä MR, Aguilar-Pontes MV, Van Rossen-Uffink D, Peng M, De Vries RP (2018) The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA. *Sci Rep* 8:1–8 . doi: 10.1038/s41598-018-25152-x
- Mäkelä MR, Bouzid O, Robl D, Post H, Peng M, Heck A, Altelaar M, de Vries RP (2017)

- Cultivation of *Podospora anserina* on soybean hulls results in efficient enzyme cocktail for plant biomass hydrolysis. *N Biotechnol* 37:1–10
- Mäkelä MR, Donofrio N, Vries RP De (2014) Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genet Biol* 72:2–9 . doi: 10.1016/j.fgb.2014.08.010
- Malgas S, Thoresen M, van Dyk JS, Pletschke BI (2017) Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol* 103:1–11 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.04.007
- Marco JI da C, Souza-Neto GP, Castro CFS, Michelin M, Polizeli MDLTM, Ferreira-Filho EX (2015) Partial Purification and Characterization of a Thermostable β -Mannanase from *Aspergillus foetidus*. *Appl Sci* 5:881–893 . doi: 10.3390/app5040881
- Mielenz JR, Bardsley JS, Wyman CE (2009) Bioresource Technology Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour Technol* 100:3532–3539 . doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.044
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428
- Mistry V V, Maubois J (2017) Application of Membrane Separation Technology to Cheese Production. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett D w (eds) *Cheese*, 4th edn. Elsevier Ltd, pp 677–697
- Montibeller VW (2015) Mananase: produção por via convencional e recombinante e obtenção de produto formulado líquido. Universidade Federal do Paraná
- Moreira GM (2016) DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Clonostachys* NO BRASIL LAVRAS - MG. Universidade Federal de Lavras
- Moreira GM, Abreu LM, Carvalho VG, Schroers HJ, Pfenning LH (2016) Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycol Prog* 15:1031–1039 . doi: 10.1007/s11557-016-1224-6
- Moreira LRS, Filho EXF (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:165–178 . doi: 10.1007/s00253-008-1423-4
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012a) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: Show K-Y, Guo X (eds) *Industrial Waste*, 1st edn. InTech, Rijeka, p 274
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012b) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: *Industrial waste*. pp 121–140
- Nadaroglu H, Dikbas N (2018) Purification and Characterization of Linamarase from *Lactobacillus Plantarum*. *J Bacteriol Mycol* 4:1–6 . doi: 10.26420/jbacteriolmycol.2017.1045
- Nevalainen H, Peterson R (2014) Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much ? *Front Microbiol* 5:1–10 . doi: 10.3389/fmicb.2014.00075
- Obembe OO, Jacobsen E, Visser RGF, Vincken J-P (2006) Cellulose-hemicellulose networks as target for in planta modification of the properties of natural fibres. *Biotechnol Mol Biol Rev* 1:76–86
- Ochoa-villarreal M, Aispuro-hernández E, Vargas-Arispu I, Martínez-Téllez MÁ (2012) *Plant Cell*

- Wall Polymers : Function , Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In: Gomes A de S (ed) Polymerization, 1st edn. Intechopen
- Ostergaad LH, Olsen HS (2011) Industrial Applications of Fungal Enzymes. In: Hofrichter M (ed) Industrial applications, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg, pp 269–290
- Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238:627–642 . doi: 10.1007/s00425-013-1921-1
- Pauly M, Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J* 54:559–568 . doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x
- Penido A, Mendes P, Campos I, Mendes L (2020) *Malaysian Journal of Microbiology*. *Malays J Microbiol* 16:396–406 . doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose , hemicellulose and lignin : an overview. *Int Microbiol* 5:53–63 . doi: 10.1007/s10123-002-0062-3
- Pinto ASB (2019) Efeito gastroprotetor da gom guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e galactomanana da fava danta (*dimorphandra gardneriana*) na gastrite experimental induzida por álcool. Universidade do Ceará
- Polleto P (2015) Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo. Universidade e Caxias do Sul
- Ponnusamy VK, Nguyen DD, Dharmaraja J, Shobana S, Banu JR, Saratale RG, Chang SW, Kumar G (2019) A review on lignon structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour Te* 271:462–472 . doi: 0.1016/j.biortech.2018.09.070
- Popper ZA (2008) Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* 11:286–292 . doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.012
- Purchart V, Vrsanská M, Svoboda P, Pohl J, Ögel ZB, Biely P (2004) Purification and characterization of two forms of endo- h -1 , 4-mannanase from a thermotolerant fungus , *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochim Biophys Acta* 1674:239–250 . doi: 10.1016/j.bbagen.2004.06.022
- Qing Q, Guo Q, Zhou L, Gao X, Lu X, Zhang Y (2017) Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of soybean hull and soybean straw to produce fermentable sugars. *Ind Crops Prod* 109:391–397 . doi: 10.1016/j.indcrop.2017.08.051
- Qin L, Li WC, Liu L, Zhu JQ, Li X, Li BZ, Yuan YJ (2016) Inhibition of lignin - derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnol Biofuels* 9:1–10 . doi: 10.1186/s13068-016-0485-2
- Reiter W-D (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 5:536–542 . doi: 10.1016/S1369-5266(02)00306-0
- Robles Barros PJ, Ramirez Ascheri DP, Siqueira Santos ML, Morais CC, Ramirez Ascheri JL, Signini R, dos Santos DM, de Campos AJ, Alessandro Devilla I (2020) Soybean hulls: Optimization of the pulping and bleaching processes and carboxymethyl cellulose synthesis. *Int J Biol Macromol* 144:208–218 . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.074
- Rocha hELDER A, Silva AJ, Gómez-mendoza DP, Santos Junior ACM, Cologna NM, Almeida RoM, Sousa M v, Ricart CAO, Ferreira-Filho EX (2017) Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. *J Biotechnol* 254:51–58 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.001

- Rodrigues SLc, Moreira RLDS, Cardoso MH, Merçon F (2003) AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ULTRAFILTRAÇÃO DE SUCO DE BANANA 1. *Food Sci Technol* 23:98–101
- Rodríguez MM (2016) Lignin biomass conversion into chemicals and fuels. Technical University of Denmark
- Rojas MJ (2012) Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja. Universidade Federal de São Carlos
- Rojas MJ, Siqueira PF, Miranda LC, Tardioli PW, Giordano RLC (2014) Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production. *Ind Crops Prod* 61:202–210 . doi: 10.1016/j.indcrop.2014.07.0
- Roy MD, Peterson ME, Danson MJ, Price NC, Kelly SM, Monk CR, Weinberg CS, Oudshoorn ML, Lee CK (2010) The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemistry* 425:353–360 . doi: 10.1042/BJ20091254
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour Bioprocess* 5:1–15 . doi: 10.1186/s40643-017-0187-z
- Sakai K, Mochizuki M, Yamada M, Shinzawa Y, Minezawa M, Kimoto S, Murata S, Kaneko Y, Ishihara S, Jindou S, Kobayashi T, Kato M, Shimizu M (2017) Biochemical characterization of thermostable β -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3237–3245 . doi: 10.1007/s00253-017-8107-x
- Saraiva RM, M PEF De, Borges ÁV (2014) USO E PERSPECTIVA DE *Clonostachys rosea* COMO AGENTE DE BIOCONTROLE USE AND PROSPECT OF *Clonostachysrosea* as A BIOCONTROL AGENT. *Rev Ciências Agrícolas* 31:78–91
- Schroers AH, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W, Samuels J, Seifert KA (1999) Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other fungi. *Mycologia* 91:365–385
- Schroers H (2001) A monograph of *Bionectria* and its *Clonostachys* anamorphs. Centraalbureau voor Schimmelcultuur
- Sciuto DL (2017) Cellulose-degrading enzyme production by *Clonostachys byssicola*: Partial purification and characterization of an endoglucanase. *Mycosphere* 8:415–431 . doi: 10.5943/mycosphere/8/3/4
- Sciuto D Lo (2015) Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase. Universidade de Brasília
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219–228 . doi: 10.1016/S1369-5274(03)00056-0
- Sharma M, Sangwan RS, Khatkar BS, Singh SP (2021) Development of a Prebiotic Oligosaccharide Rich Functional Beverage from Sweet Sorghum Stalk Biomass. *Waste and Biomass Valorization* 12:2001–2012 . doi: 10.1007/s12649-020-01156-5
- Sharma S, Vaid S, Bhat B, Singh S, Bajaj BK (2019) Thermostable enzymes for industrial biotechnology. In: Singh RS, Singhania RR, Pandey A, Larroche C (eds) *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier B.V., pp 469–495
- Sheng Y, Lam SS, Wu Y, Ge S, Wu J, Cai L, Huang Z, Le Q Van, Sonne C, Xia C (2021) Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresour Technol* 324: . doi: 10.1016/j.biortech.2020.124631

- Shimizu M, Kaneko Y, Ishihara S, Mochizuki M, Sakai K, Yamada M, Murata S, Itoh E, Yamamoto T, Sugimura Y, Hirano T, Takaya N, Kobayashi T, Kato M (2015) Novel β -1, 4-Mannanase Belonging to a New Glycoside Hydrolase Family in *Aspergillus nidulans* *. *J Biol Chem* 290:27914–27927 . doi: 10.1074/jbc.M115.661645
- Silva C de OG, Santos Júnior A de CM, Santana RH, Krüger RH, Fontes W, de Sousa MV, Ricart CAO, Ferreira Filho EX (2019) Mild hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse enhances the production of holocellulases by *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:1517–1529 . doi: 10.1007/s10295-019-02207-0
- Silva CD, Kazama R, Faustino JO, Zambom A, Santos GT, Branco AF (2004) Digestibilidade in vitro e degradabilidade in situ da casca do grão de soja , resíduo de soja e casca de algodão. *Anim Sci* 26:501–506
- Silva COG, Ribeiro JA de A, Souto AL, Abdelnur PV, Batista LR, Rodrigues KA, Parachin NS, Filho EXF (2018) Sugarcane Bagasse Hydrothermal Pretreatment Liquors as Suitable Carbon Sources for Hemicellulase Production by *Aspergillus niger*. *Bioenergy Res* 11:316–329 . doi: 10.1007/s12155-018-9898-z
- Silva COG, Vaz RP, Ferreira-Filho EX (2017) Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 12:277–289 . doi: 10.1002/bbb.1832
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS (2011a) Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. *Phytochemistry* 72:2352–2360 . doi: 10.1016/j.phytochem.2011.08.020
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS (2011b) O revestimento das samambaias. São Paulo
- Sluiter A, Hames R, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Tepleton D, Crocker D (2008a) Determination of structural carbohydrates and Lignin in biomass. Tech Rep NREL
- Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D (2008b) Chirurgie des métastases pulmonaires des cancers colorectaux : facteurs prédictifs de survie. Tech Rep NREL 0:0
- Soni H, Kumar H, Brett R, Naveen IP (2016) Purification and characterization of β -mannanase from *Aspergillus terreus* and its applicability in depolymerization of mannans and saccharification of lignocellulosic biomass. *3 Biotech* 6:1–11 . doi: 10.1007/s13205-016-0454-2
- Soni H, Rawat HK, Ahirwar S, Kango N (2017) Screening , statistical optimized production , and application of β -mannanase from some newly isolated fungi. *Eng Life Sci* 17:392–401 . doi: 10.1002/elsc.201600136
- Souza WR, Maitan-alfenas, Gabriela P Gouvêa PF, Brown NA, Savoldi M, Battaglia E, Goldman MHS, de Vries RP, Goldman GH (2013) The influence of *Aspergillus niger* transcription factors AraR and XlnR in the gene expression during growth in D -xylose , L -arabinose and steam-exploded sugarcane bagasse. *Fungal Genet Biol* 60:29–45 . doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.007
- Srivastava PK, Kapoor M (2017) Production , properties , and applications of endo - β -mannanases. *Biotechnol Adv* 35:1–19 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.001
- Sticklen MB (2008) Plant genetic engineering for biofuel production : towards affordable

- cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* 9:433–443 . doi: 10.1038/nrg2336
- Tanimoto T, Ikuta A, Sugiyama M, Koizumi K (2002) HPLC analysis of manno-oligosaccharides derived from *Saccharomyces cerevisiae* mannan using an amino column or a graphitized carbon column. *Chem Pharm Bull* 50:280–283 . doi: 10.1248/cpb.50.280
- Tejirian A, Xu F (2010) Inhibition of Cellulase-Catalyzed Lignocellulosic Hydrolysis by Iron and Oxidative Metal Ions and Complexes. *Appl Environ Microbiol* 76:7673–7682 . doi: 10.1128/AEM.01376-10
- Thomas LH, Forsyth VT, Adriana Š, Kennedy CJ, May RP, Altaner CM, Apperley DC, Wess TJ, Jarvis MC (2013) Structure of Cellulose Micro fibrils in Primary Cell Walls. *Plant Physiol* 161:465–476 . doi: 10.1104/pp.112.206359
- Tian Y, Jiang Y, Ou S (2013) Interaction of cellulase with three phenolic acids. *Food Chem* 138:1022–1027 . doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.129
- Toro-trochez JL, Carrillo-pedraza ES, Bustos-Martínes D, García-mateos FJ, Ruiz-Rosas RR, Rodríguez-Mirasol J, Cordero T (2019) Thermogravimetric characterization and pyrolysis of soybean hulls. *Bioresour Technol Reports* 6:183–189 . doi: 10.1016/j.biteb.2019.02.009
- Uechi K, Watanabe M, Fujii T, Kamachi S, Inoue H (2020) Identification and Biochemical Characterization of Major β -Mannanase in *Talaromyces cellulolyticus* Mannanolytic System. *Appl Biochem Biotechnol* 192:616–631 . doi: 10.1007/s12010-020-03350-6
- Uenojo M, Pastore M (2007) Revisão. *Quim Nova* 30:388–394
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin Biosynthesis and Structure 1. *Plant Physiol* 153:895–905 . doi: 10.1104/pp.110.155119
- Vasconcellos VM, Tardioli PW, Giordano RLC, Farinas CS (2016) Addition of metal ions to (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *N Biotechnol* 33:331–337
- Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, Beldman G, Visser RGF, Voragen AGJ (2003) Pectin the hairy thing. In: Voragen F, Schols H, Visser R (eds) *Advances in Pectin and Pectinase Research*, 1st edn. Springer, Dordrecht, pp 47–61
- Visser EM, Falkoski DL, de Almeida MN, Maitan-Alfenas GP, Guimarães VM (2013) Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 144:587–594 . doi: 10.1016/j.biortech.2013.07.015
- Voragen AGJ, Coenen G-J, Verhoef RP, Schols HA (2009) Pectin , a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem* 20:263–275 . doi: 10.1007/s11224-009-9442-z
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol Adv* 23:115–129 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.11.001
- Wang NN, Liu J, Li YX, Ma JW, Yan QJ, Jiang ZQ (2021) High-level expression of a glycoside hydrolase family 26 β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for production of partially hydrolysed fenugreek gum. *Process Biochem* 100:90–97 . doi: 10.1016/j.procbio.2020.09.034
- Wessel D, Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141–143 . doi: 10.1016/0003-

2697(84)90782-6

- Whistler RL (2012) Hemicelluloses. In: Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives: Third Edition. pp 295–308
- Wingfield MJ, Beer ZWDE, Slippers B, Wingfield BD, Groenewald JZ, Lombard L, Crous PW (2012) One fungus , one name promotes progressive plant pathology. One fungus, one name Promot Progress plant Pathol 13:604–613 . doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00768.X
- Xie J, Pan L, He Z, Liu W, Zheng D, Zhang Z, Wang B (2020) A novel thermophilic β -mannanase with broad-range pH stability from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic effect with α -galactosidase on hydrolyzing palm kernel meal. Process Biochem 88:51–59 . doi: 10.1016/j.procbio.2019.09.029
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2010) Enzyme and Microbial Technology Inhibition of cellulases by phenols. Enzyme Microb Technol 46:170–176 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.11.001
- Ximenes EA, Chen H, Kataeva IA, Cotta MA, Felix CR, Ljungdahl LG, Li X (2005) A mannanase , ManA , of the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* sp . strain PC-2 has carbohydrate binding and docking modules. J Microbiol 51:559–568 . doi: 10.1139/W05-033
- Xin D, Ge X, Sun Z, Viikari L, Zhang J (2015) Competitive inhibition of cellobiohydrolase I by manno-oligosaccharides. Enzyme Microb Technol 68:62–68 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.09.009
- Yang H, Shi P, Lu H, Wang H, Luo H, Huoqing H, Yang P (2015) A thermophilic β -mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 which broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers. Food Chem 173:283–289
- York WS, Darvill AG, McNeil M, Stevenson TT, Albersheim P (1986) Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. Methods Enzymol 118:3–40 . doi: 10.1016/0076-6879(86)18062-1
- Yu S, Li Z, Wang Y, Chen W, Fu L, Tang W, Chen C (2015) High-level expression and characterization of a thermophilic β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. Biotechnol Lett 37:1853–1859 . doi: 10.1007/s10529-015-1848-7
- Zhang J, Zhou H, Liu D, Zhao X (2019) Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose, 1st edn. Academic Press

CAPÍTULO III

**Avaliação do potencial
do extrato bruto de
Clonostachys byssicola
para a sacarificação de
*diferentes substratos***

INTRODUÇÃO

A parede celular vegetal tem sido definida por alguns pesquisadores como estrutura codificada, pois existe um conjunto de mecanismos responsáveis por estabelecer a arquitetura e função biológica da parede celular, resultando em uma complexidade de arranjos de polímeros (Buckeridge 2018). O código glicômico proposto por Buckeridge (2018), faz referência ao conjunto de hemiceluloses mostrando que a resistência da degradação desses componentes, pode estar relacionada com a interação de diferentes polímeros e pelo padrão de ramificações dos polissacarídeos. A recalcitrância da parede celular vegetal é uma barreira para a produção de tecnologias que envolvem a utilização de oligossacarídeos. A fim de interromper a natureza recalcitrante da parede celular da biomassa vegetal diversas técnicas têm sido abordadas, dentre elas podem ser citados os processos químicos, físicos e biológicos. A utilização de enzimas como moléculas biológicas para a degradação de resíduos lignocelulósicos, também denominada sacarificação, vem ganhando grande atenção, principalmente no emprego de enzimas combinadas para a formação de coquetéis enzimáticos.

A sacarificação enzimática é uma etapa essencial para que haja a conversão dos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal em oligossacarídeos fermentescíveis. Embora os pesquisadores tenham trabalhado por décadas para melhorar a eficiência da hidrólise enzimática, a utilização de enzimas produzidas por um único microrganismo para uma eficiente despolimerização da biomassa vegetal ainda é um desafio para a ciência (Sheng et al. 2021). No entanto, as vantagens de se utilizar as enzimas nesse processo são: a redução ou eliminação de compostos químicos, o emprego de condições de pré-tratamento moderados, a baixa geração de inibidores e o menor impacto ambiental (Zhang et al. 2019). Nesse sentido, uma das estratégias que vem desenvolvendo-se a fim de reduzir os custos da produção de enzimas é a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono, indutores de um *pool* de enzimas secretadas pelos microrganismos. Estas enzimas podem ser posteriormente utilizadas em processos de sacarificação enzimática com a finalidade de gerarem produtos a serem utilizados em diferentes processos industriais.

Os tipos de resíduos agroindustriais utilizados, de um modo geral, refletem a atividade agrícola abundante em cada região. Assim como a soja, a cana de açúcar, e o café estão entre as maiores culturas da economia brasileira (CONAB, 2021), grande parte de seus resíduos gerados pelo processamento industrial são descartados ao meio ambiente

inadequadamente constituindo um problema ambiental de grande magnitude. A comprovação da rica composição em nutrientes desses materiais para o crescimento de microrganismos tem sugerido que umas das estratégias mais promissoras para o gerenciamento desses resíduos agroindustriais é sua utilização na produção de enzimas microbianas. A sacarificação enzimática é considerada uma via segura e ecológica, capaz de desencadear importantes produtos industriais como os oligossacarídeos (Barcelos et al. 2020).

Os oligossarídeos hemicelulósicos abarcam uma classe de oligossacarídeos não digeríveis e têm sido utilizados como moléculas prebióticas. O emprego desses carboidratos como prebióticos, além de melhorarem o crescimento de microrganismos benéficos para o intestino, podem estar relacionados com a qualidade de alguns alimentos (Sharma et al. 2021). Visando a compreensão dos produtos de hidrólise resultantes durante a sacarificação dos resíduos lignocelulósicos, o extrato bruto produzido por *C. byssicola* foi utilizado com o propósito de avaliar o potencial das enzimas que degradam os componentes hemicelulósicos para a produção de mano-oligossacarídeos e outros oligossacarídeos presentes na parede celular vegetal da casca do grão da soja, bagaço de cana, goma de alfarroba e goma de guar.

OBJETIVO

Avaliar o potencial do extrato bruto concentrado de *Clonostachys byssicola* na sacarificação da casca do grão da soja, do bagaço de cana, da goma de alfarroba e da goma de guar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química da casca do grão da soja
- Avaliar o perfil de açúcares redutores totais produzidos em resposta às diferentes fontes de carbono
- Detectar os oligossacarídeos e monossacarídeos produzidos pelos diferentes ensaios de sacarificação enzimática por meio da cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção por pulso amperométrico (do inglês High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD)).

METODOLOGIA

ANÁLISE BROMATOLÓGICA

A casca do grão da soja obtida após o pré-tratamento (condição 1) foi submetida à análise bromatológica de acordo com o método estabelecido pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (do inglês National Renewable Energy Laboratory, NREL). Uma massa de 1,5 g de material foi inserida numa trouxa de papel de filtro e transferido para um extrator Soxhlet. A amostra foi lavada primeiramente em água e depois com etanol 95% durante um período de 24 h. Após a extração, a biomassa foi submetida a secagem em estufa 60 °C e posteriormente foi pesada (a diferença das massas é correspondente aos compostos extraíveis, sendo expresso em porcentagem) (Sluiter et al. 2008a). A composição da biomassa também foi analisada de acordo com a metodologia recomendada pela NREL (Sluiter et al. 2008b), no qual a biomassa foi primeiramente hidrolisada com ácido sulfúrico 72 % (m/m) a 30 °C durante 1 hora, seguido por uma segunda hidrólise em que o ácido foi diluído para uma concentração final de 4 % (m/m) e autoclavado por um período de 2 horas a 121 °C. Posteriormente, o material foi filtrado obtendo-se duas frações: a parte sólida (utilizada para a quantificação de lignina ácido-insolúvel e o teor de cinzas); a parte líquida foi utilizada para quantificação de carboidratos.

ENSAIOS ENZIMÁTICOS COM SUBSTRATOS SINTÉTICOS

As atividades de β -glicosidase, β -manosidase, β -xilosidase e β -galactosidase foram determinadas utilizando os substratos sintéticos 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG), 4-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (pNPM), 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX), 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (pNPGal), respectivamente. Os ensaios foram realizados utilizando 5 μ l do extrato bruto concentrado (EBC), 25 μ l de substrato e 45 μ l de tampão acetato pH 5 100mM. Os tubos foram incubados a 50 °C por um período de 30 min e posteriormente a reação foi interrompida pela adição de 75 μ l de carbonato de sódio 1M. A absorbância das amostras foi analisada a 430 nm e os valores de atividade enzimática calculados de acordo com a curva de calibração de 4-nitrofenol (pNP). A atividade enzimática foi expressa em UI/mL (sendo UI a quantidade de enzima necessária

para liberar 1 μ mol de produto por minuto nas condições do ensaio).

ENSAIOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NAS BIOMASSAS

Com o intuito de avaliar a melhor metodologia para a produção de açúcares redutores duas condições de hidrólise foram testadas:

Condição 1:

Uma quantidade de 2 mg de enzima por g de diferentes substratos (casca de soja, bagaço de cana, goma de alfarroba e goma de guar) foi incubada em tubos de 1,5 mL em tampão 50 mM de acetato de sódio pH 5, com um volume final de 1 mL, utilizando *vortemp* (Labnet) sob agitação de 720 rpm, a 40 °C, durante 5 dias.

Condição 2:

O EBC foi incubado com os diferentes substratos (casca do grão de soja, bagaço de cana, goma de alfarroba, goma de guar) na concentração final de 1% em tubos de 1,5 mL por cinco dias (na proporção de 1:2 de amostra/tampão acetato de sódio pH 5). Os ensaios de hidrólise foram realizados em *vortemp* (Labnet) com um volume final de 1 mL, sob agitação de 720 rpm a 40 °C.

Para os ensaios de hidrólise, os tubos foram retirados durante o período de 8, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Em seguida, as amostras foram fervidas e quantificadas por meio do método DNS. Também, alíquotas de amostras foram armazenadas a -20 °C, para posteriores análises por HPLC (Cromatografia líquida de alta performance). Para os controles enzimáticos, as amostras foram incubadas em tampão 50 mM de acetato de sódio pH 5,0 na ausência de substrato, do mesmo modo o substrato foi incubado com o mesmo tampão na ausência da enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicada.

ANÁLISE POR HPLC DAS AMOSTRAS DO ENSAIO DE HIDRÓLISE

ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS

Alíquotas provenientes dos ensaios de hidrólise foram utilizadas para a análise em cromatografia líquida de alta eficiência de troca aniônica, acoplada a um detector de amperometria pulsada (HPAE-PAD), com o intuito de quantificar e identificar os oligossacarídeos liberados. Durante o ensaio de hidrólise, as amostras foram analisadas em sistema Dionex ICS 3000 DC Ion Chromatography com utilização de pré-coluna

CarboPac Guard e coluna CarboPac PA-100 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). Foram injetados 500 μ L de amostra com o *auto sampler* AS40 (Dionex), com o fluxo de 2,5 mL/min. As amostras foram eluídas em solução de 0,1 M de hidróxido de sódio e solução de 0,5 M de acetato de sódio. Os dados obtidos foram analisados pelo *software Chromeleon 6.8 SR8* (Dionex). Para a análise dos monossacarídeos foi utilizada a coluna CarboPac PA-10 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). Foram injetados 500 μ L de amostra com o *auto sampler* AS40 (Dionex), com o fluxo de 2,0 mL/min. As amostras foram eluídas em solução de hidróxido de sódio (0,2 M) e solução de acetato de sódio (0,5 M). Os dados obtidos foram analisados pelo *software Chromeleon 6.8 SR8* (Dionex). Foram preparadas curvas de calibração para a quantificação de monossacarídeos e oligossacarídeos. A priori, foram feitas várias soluções contendo monossacarídeos e oligossacarídeos na concentração final de 1 mg/mL. Posteriormente, foi feito um *mix* contendo todos os monossacarídeos e oligossacarídeos e distintas (variando de 0,0025-0,005 mg/mL).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As imagens de MEV foram obtidas no microscópio quanta 200- FEG/FEI com canhão de emissão por efeito de campo, utilizando voltagem de 15 kV (Centro de Microscopia da Laboratório de Microscopia da UnB). Com o propósito de observar as diferenças estruturais na superfície da biomassa, as amostras obtidas após 96 horas de hidrólise nos diferentes substratos foram submetidas à secagem em estufa a 40 °C e posteriormente metalizadas em equipamento *Sputter Coater* SCD 050.

Para todos os experimentos realizados foram calculados o erro padrão, sendo este inferior a 10%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A Figura 20, mostra a liberação de açúcares redutores totais pela sacarificação da goma de guar, casca de soja, bagaço de cana e goma de alfarroba, por enzimas do EBC em duas condições diferentes.

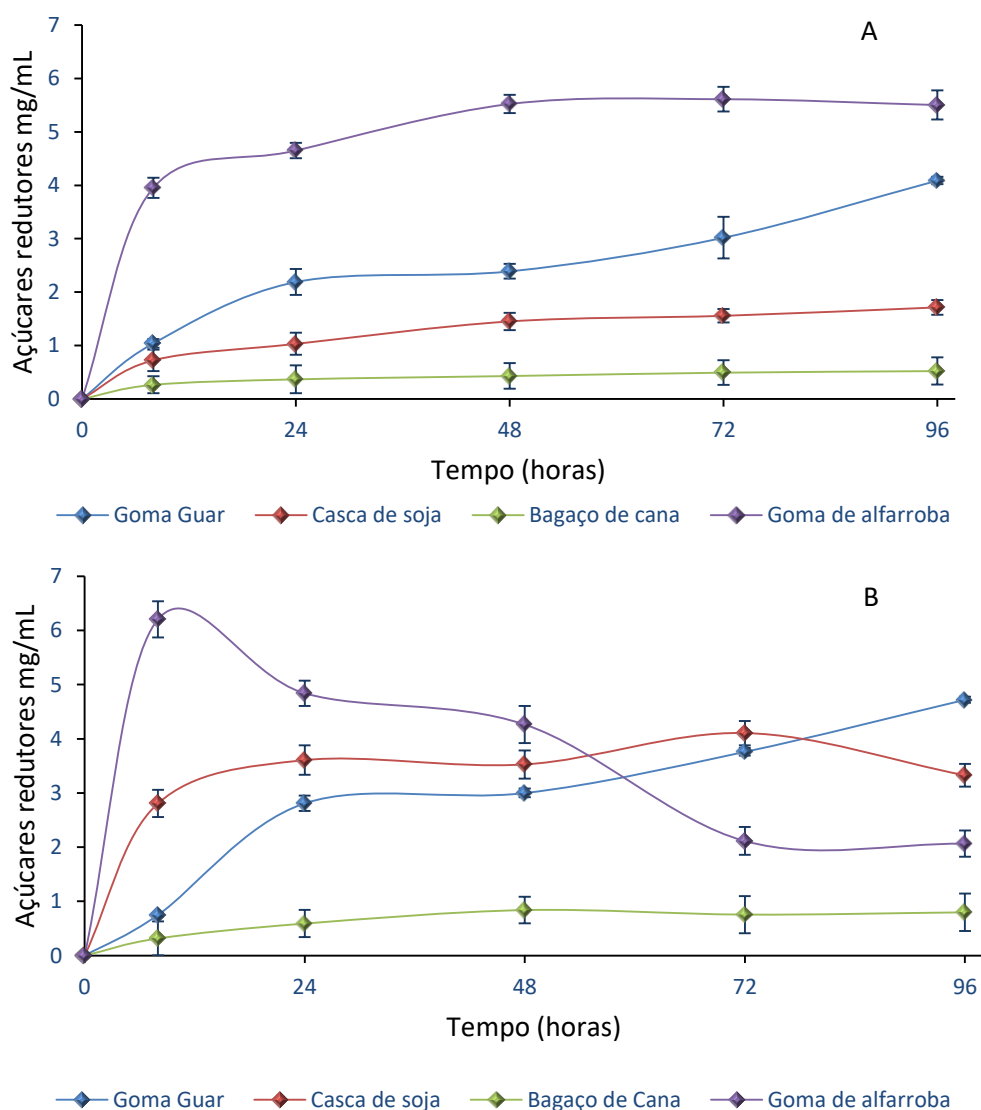


Figura 20. Quantificação de açúcares redutores totais por DNS obtidos pela hidrólise da goma de guar, casca de soja, bagaço de cana e goma de alfarroba pelas enzimas do EBC de *Clonostachys byssicola* nos tempos de 8, 24, 48, 72 e 96h. A: condição 1: sacarificação realizada utilizando 2 mg de proteínas por g de substrato; B condição 2: sacarificação utilizando um volume de enzima por dois volumes de tampão em 1% de substrato. Ambas as hidrólise foram realizadas em tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM) à 40 °C.

Pela análise dos gráficos, a goma de alfarroba mostrou-se o substrato mais hidrolisável em ambas as condições (Figura 20 A e B), obtendo um aumento contínuo de açúcares redutores ao longo do tempo na condição 1 com as maiores quantidades de açúcares redutores produzidos no tempo de 72 horas (Figura 20-A). O aumento de açúcares redutores também pode ser observado durante a hidrólise da goma de guar e da casca de soja, os quais alcançam a máxima produção em diferentes períodos de tempo de acordo com os tratamentos. Em contrapartida, uma baixa liberação de açúcares redutores e de forma quase linear foi observada para o bagaço de cana, sem mudanças significativas ao longo do tempo ($p>0,05$) em ambas condições experimentais.

Quando comparamos ambas as condições de hidrólise, o perfil de liberação de açúcares redutores na figura 20-B, mostrou-se diferente para a goma de alfarroba, no qual a concentração total de açúcares alcança seu pico máximo em apenas 8 horas de incubação, seguido por um decréscimo de liberação até o tempo de 72h e permanecendo estável no tempo seguinte. Esta diferença pode ser explicada pela concentração de enzimas presente na condição 2 da hidrólise. Nesta metodologia, um volume maior de enzima foi adicionado para sacarificar 1% de substrato, resultando em uma concentração de enzima 12 vezes maior em relação aos resultados da Figura 20A. Por isso, a conversão do substrato em açúcares redutores aumenta com o aumento da concentração de enzimas mostrando um máximo as 8h Figura 20-B. A diminuição dos açúcares redutores produzidos a partir goma de alfarroba entre as 8h e 72 h (Figura 20-B) podem ser devido a diferentes fatores, incluindo modificação, inibição por produto das enzimas, inativação enzimática, reversibilidade da reação de hidrólise entre outros. Com relação aos demais substratos, a maior dosagem de enzima, mostrou-se significativa apenas para hidrólise da casca de soja, não havendo diferenças significativas para a goma de guar e bagaço de cana ($p>0,05$).

As diferenças estruturais dos substratos utilizados para a sacarificação enzimática estão diretamente associadas as quantidades de açúcares redutores liberadas ao longo da hidrólise. Estudos da composição e estrutura da cana de açúcar evidenciaram que os principais componentes hemicelulósicos encontrados na parede celular são os arabinoxilanos, xiloglicanos, com relativamente poucas quantidades de mananas. Além do mais, quantidades menores de pectina foram detectadas (de Souza et al. 2013). As quantidades de lignina no bagaço de cana e a casca do grão da soja diferem para 21,27 % (Silva et al. 2018) e 6,59 % (Tabela 9), respectivamente. Por isso, é possível que a alta porcentagem de lignina no bagaço de cana tenha impedido a exposição das fibras de

hemicelulose, dificultando a ação hidrolítica das enzimas, o que explica as diferenças encontradas nos resultados de ambos substratos. Nesse sentido, é de se esperar que hemicelulases liberem maiores quantidades de oligômeros com vários graus de polimerização durante a degradação da casca de soja, em virtude de menores porcentagens de lignina presente nesse substrato.

Tabela 9. Comparação da composição bromatológica dos diferentes componentes presentes na parede celular da casca do grão de soja.

Substratos	Celulose	Hemicelulose	lignina	referências
Casca de soja	42,03 %	19 %	6,59%	Este trabalho
Casca de soja	37%	27 %	8%	(Karp et al. 2021)
Casca de soja	40,62%	33,78%	7,75%	(Robles Barros et al. 2020)

Os dados mostrados na tabela acima, corroboram com outros estudos da composição química da casca do grão de soja com 37-42% de celulose, 19-34% de hemicelulose e 6-8% de lignina (Tabela 9). Liu et al. 2016, mostraram que a composição química da casca do grão de soja é caracterizada principalmente pela presença de carboidratos e proteínas, e dentre os tipos de hemiceluloses encontradas na sua parede celular a arabinose foi o açúcar predominante com 35,6-46,9% dos açúcares totais, seguido pela galactose (25-26,8%) e manose (15,8-30,4%).

Comparando a liberação de açúcares redutores entre os substratos compostos de galactomananas (goma de alfarroba e goma de guar) pode-se estabelecer uma correlação entre a quantidade de açúcares liberados e a estrutura dos substratos. Enquanto a goma de alfarroba é composta por uma proporção de manose e galactose de 4:1, a taxa desses componentes para a goma de guar é de 2:1. Como consequência, a proporção de manose/galactose é um fator chave na influência da rigidez da cadeia e viscosidade, fatores que podem afetar a hidrólise enzimática (Liu et al. 2020a). É provável que as maiores quantidades de substituintes laterais de galactose na goma de guar podem ter causado um impedimento estereoquímico, impossibilitando o acesso das enzimas do extrato bruto concentrado aos componentes de manana, resultando em uma liberação de açúcares redutores mais lentos, em ambas as condições de hidrólise. Por outro lado, a menor proporção de substituintes laterais na goma de alfarroba proporcionou maior rendimento da sacarificação.

Quando analisamos a hidrólise enzimática utilizando o EBC com a enzima

comercial (cellic Ctec2 novozymes) (Figura 21), podemos notar que a presença de celulases na mistura enzimática comercial, foi capaz de intensificar a liberação de açúcares redutores predominantemente nos substratos mais complexos, como a casca do grão da soja e o bagaço de cana. Essa melhora pode ser explicada em decorrência da ação combinada de diferentes enzimas, visto que as preparações de misturas enzimáticas de dois ou mais componentes atuam sinergicamente e proporcionam um resultado melhor em comparação ao componente individual (Visser et al. 2013).

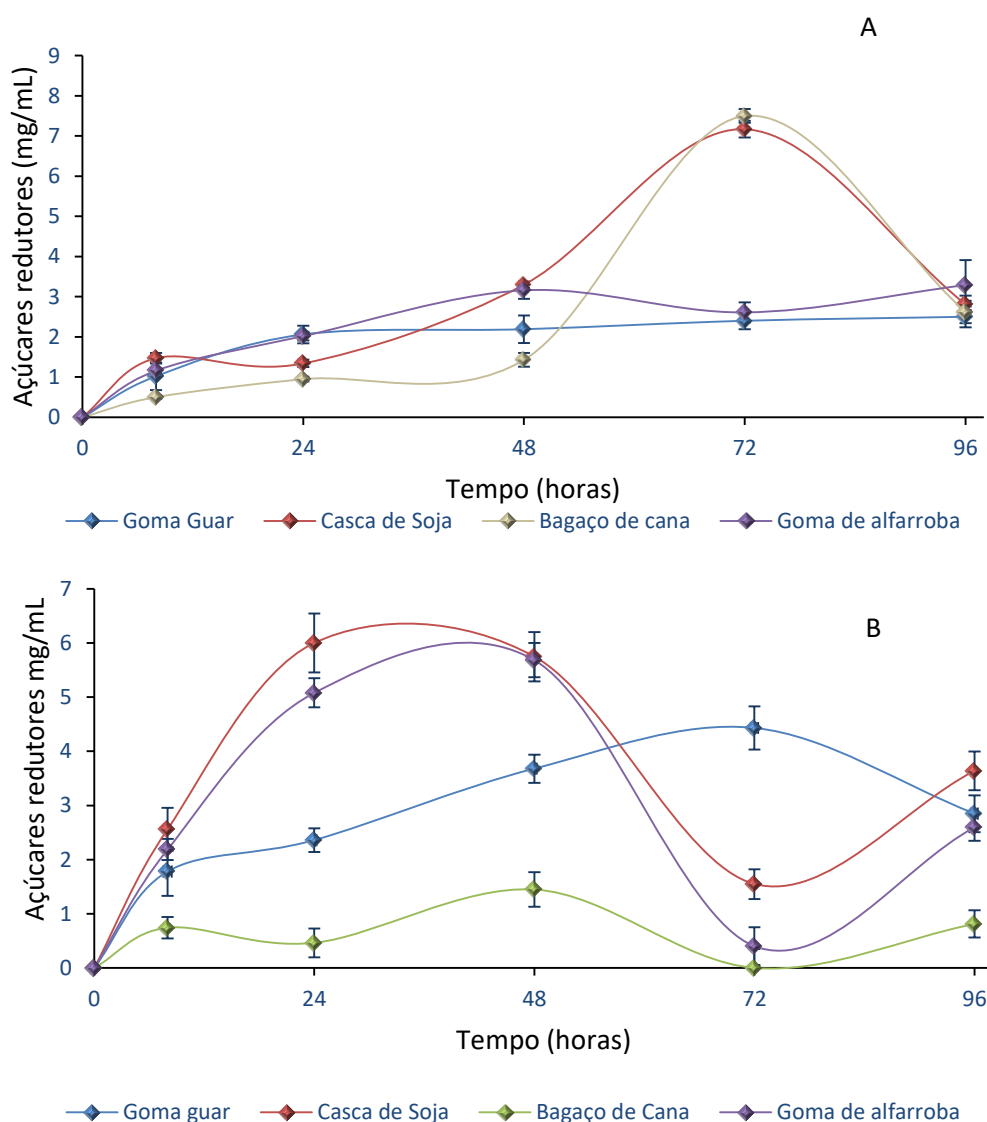


Figura 21. Quantificação de açúcares redutores totais por DNS obtidos pela hidrólise da goma de guar, casca de soja, bagaço de cana e goma de alfarroba utilizando a enzima comercial (Cellic Ctec2-novozymes), nos tempos de 8, 24, 48, 72 e 96 horas. A: condição 1: sacarificação realizada utilizando 2 mg de proteínas por g de substrato 1; B condição 2: sacarificação utilizando um volume de enzima por dois volumes de tampão em 1% de substrato. Ambas as hidrólise foram realizadas em tampão acetato de sódio pH 5,0 (50 mM) à 40 °C.

Ao avaliarmos o perfil de liberação de açúcares pela enzima comercial, o tempo de 72 horas foi o suficiente para atingir o ponto máximo de açúcares redutores na degradação da casca do grão de soja e bagaço de cana na condição 1 da sacarificação (Figura 21-A), porém, em tempos menores (entre 24-48 horas) foram atingidos o máximo de açúcares redutores na degradação da casca do grão de soja e goma de alfarroba na condição 2 da sacarificação (maior concentração de enzima) (Figura 21-B). Nessa condição 2, a hidrólise de bagaço de cana não mostrou grandes incrementos na produção de açúcares redutores (Figura 21-B). A redução da liberação de açúcares redutores para o bagaço de cana nessa condição foi um resultado inesperado, provavelmente o aumento da concentração de enzimas resultou em uma acelerada degradação dos componentes hemicelulósicos, e esses oligossacarídeos causaram um efeito inibitório das celulasas presentes na mistura comercial. Alguns estudos têm relatado que a presença de xilo-oligossacarídeos, assim como mano-oligossacarídeos podem inibir a atividade de celulasas. A inibição pode ocorrer pela ligação dos oligossacarídeos no sítio ativo da enzima ou por impedimento estérico de acesso ao substrato (Xin et al. 2015). Um padrão diferente de hidrólise é notado para a goma de alfarroba e goma de guar, no qual há uma liberação constante de açúcares redutores (Figura 21-A). Com relação à condição 2 da sacarificação (Figura 21-B) pode-se constatar uma redução do tempo de hidrólise da goma de alfarroba com uma taxa de 5,68 mg de açúcares redutores no tempo de 48 horas, assim como um aumento de açúcares redutores liberados para a goma de guar atingido o pico máximo em 72 horas.

Um fato interessante que pode ser observado é quando confrontamos os resultados das enzimas do EBC e da enzima comercial em relação à sacarificação dos substratos compostos por galactomanana. O EBC produzido por *C. byssicola* contém em sua composição enzimas que facilitam a hidrólise de componentes hemicelulósicos (Figura 11 cap. 2). Algumas dessas enzimas são as mananases, enzimas do tipo endo, responsáveis por catalisarem a hidrólise de regiões internas das estruturas que contém mananas em sua composição e as galactosidases que removem os substituintes laterais de galactose. A detecção de grandes quantidades de β -glicosidases e galactosidases observada na Figura 22, em detrimento de β -xilosidases e β -manosidases, mostra que apesar do EBC não conter quantidades relevantes de β -manosidases, *C. byssicola* mostrou-se um fungo promissor para a degradação da goma de alfarroba e goma de guar. Mesmo não contento nenhum tipo de suplementação enzimática, o EBC apresentou-se mais eficiente do que a enzima comercial para a degradação dos substratos compostos

por galactomananas. Em ambas as condições, a liberação de açúcares redutores atingiu seu ponto máximo em tempos menores, característica chave do ponto de vista industrial para que haja redução custos, bem como a compreensão do sinergismo das enzimas (Malgas et al. 2017).

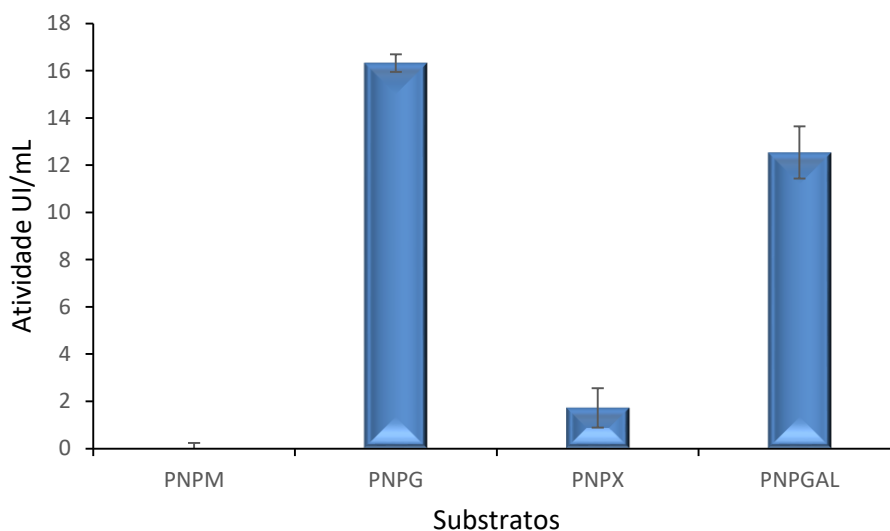


Figura 22. Perfil enzimático de β - manosidase, β -glicosidade, β - xilosidade e β -galactosidade, utilizando os substratos sintéticos 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG), 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX), 4-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo (pNPM) e 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (pNPGal), respectivamente.

Outra forma de avaliar o efeito da sacarificação enzimática pelas enzimas do EBC é observando as mudanças ao nível de estrutura após o tempo máximo de incubação (96 horas). A Figura 23 mostra a imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos diferentes substratos antes e após a hidrólise. A camada superficial dos resíduos lignocelulósicos pode compreender os componentes da parede celular. Após a hidrólise pelo EBC pode-se perceber que a camada externa compactada do bagaço de cana (Figura 23-B), quase não houve alteração, corroborando com os resultados da sacarificação, no qual pouca quantidade de açúcares foi detectada. Em contrapartida, os componentes da parede celular da casca do grão de soja foram parcialmente removidos, podendo ser observada a remoção de parte da camada superficial da parede celular (Figura 23-D). Todavia, com relação à hidrólise da goma de alfarroba e goma de guar (Figura 24) a imagem de MEV mostra uma superfície com pouca rugosidade para ambos os substratos na condição sem enzima. Uma vez incubadas com as enzimas do EBC, os substratos intensificaram a rugosidade, evidenciando que para os substratos compostos de manana,

a modificação do substrato se dá de uma forma peculiar, não demonstrando a remoção da estrutura do substrato, mas sim alterando o aspecto da galactomanana.

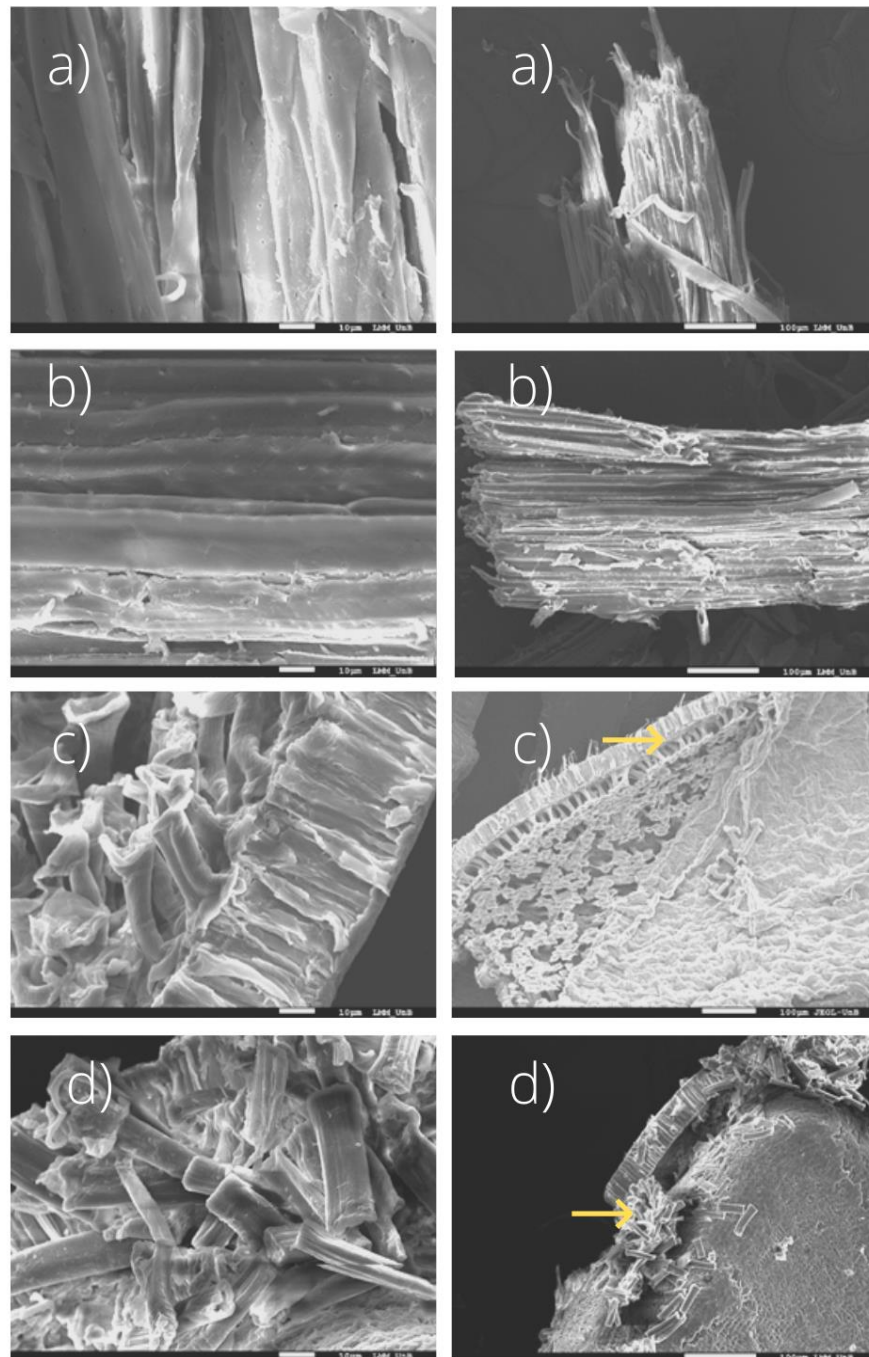


Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as modificações da estrutura superficial da parede celular, pelas enzimas do extrato bruto concentrado. Legenda: a) bagaço de cana de açúcar sem a atuação de enzimas; b) bagaço de cana de açúcar após a sacarificação enzimática; c) Casca do grão de soja sem a atuação de enzimas; d) casca do grão de soja após a sacarificação enzimática. As setas amarelas indicam a provável camada superficial da casca do grão de soja.

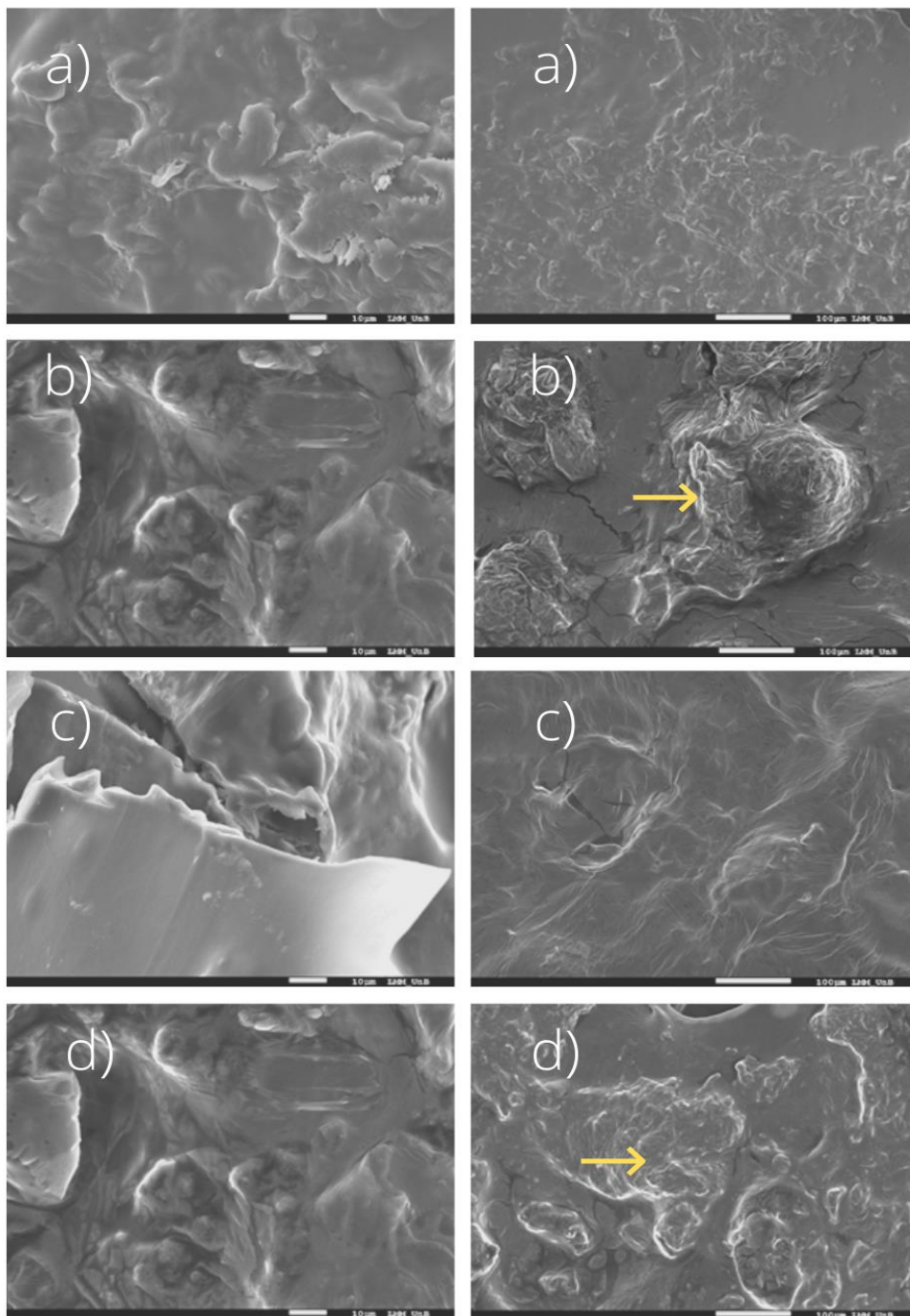


Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as modificações da estrutura das galactomananas, pelas enzimas do extrato bruto concentrado. Legenda: a) goma de alfarroba sem a atuação de enzimas; b) goma de alfarroba após a sacarificação enzimática; c) goma de guar sem a atuação das enzimas; d) goma de guar após a sacarificação enzimática. As setas amarelas indicam o aspecto rugoso das galactomananas.

ANÁLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS E MONOSSACARÍDEOS POR HPLC-DIONEX

Na detecção dos oligossacarídeos (Figura 25) apenas a condição 1 da hidrólise foi analisada, a padronização da sacarificação enzimática por carga de proteínas, além de reduzir a quantidade de enzimas utilizadas é uma forma de reduzir os custos quando pensamos em escalas maiores de hidrólise. Os principais produtos de degradação identificados nas amostras coletadas durante a hidrólise dos diferentes substratos foram manotriose, xilotriose, e quantidades reduzidas de celo-oligossacarídeos (encontrados apenas na goma de alfarroba e goma de guar). A ausência de celo-oligossacarídeos nos resíduos agroindustriais torna incontestável que as enzimas do EBC tiveram acesso apenas aos componentes hemicelulósicos dos resíduos agroindustriais. A celulose está envolta não só por hemiceluloses, mas também pectinas e ligninas, e a complexidade de todo esse conjunto de componentes ainda é um desafio para que enzimas produzidas por um único microrganismo consigam penetrar por todos esses componentes e ainda atingir um polissacarídeo altamente recalcitrante que é a celulose.

De acordo com Figura a 25-B, os produtos liberados durante a hidrólise da casca de soja foram: manobiose, manotriose e manohexaose. Oligossacarídeos como manotetraose e manopentose não foram identificados. Contudo, na degradação do bagaço de cana pode-se identificar apenas manotriose e manohexaose (Figura 25-A). De forma esperada, maiores quantidades de mano-oligossacarídeos puderam ser observadas na hidrólise de galactomananas, podendo ser identificados todos mano-oligossacarídeos na degradação da goma de alfarroba, e com exceção das manopentoses, os demais oligossacarídeos foram observados na sacarificação da goma de guar.

Com relação aos demais oligossacarídeos, a presença de celo-oligossacarídeos (Figura 26) foi detectada apenas na hidrólise da goma de alfarroba e goma de guar. Na sacarificação da goma de alfarroba (Figura 26-A) o aumento da concentração de celobiose ao longo do tempo, alcança teores máximos no período de 96 horas, seguido por uma redução de celotriose nos tempos iniciais de incubação (entre 8 e 24 horas). No que se refere aos produtos identificados nas amostras da goma de guar, a identificação de oligossacarídeos com tamanhos maiores (celopentoses) pode ser observada durante os períodos iniciais da sacarificação até o tempo de 48 horas. A degradação das celopentoses possivelmente resultou no aumento dos teores de celotetraoses e celotrioses, observados nos tempos de 48 e 72 horas e 8, 72 e 96 horas respectivamente.

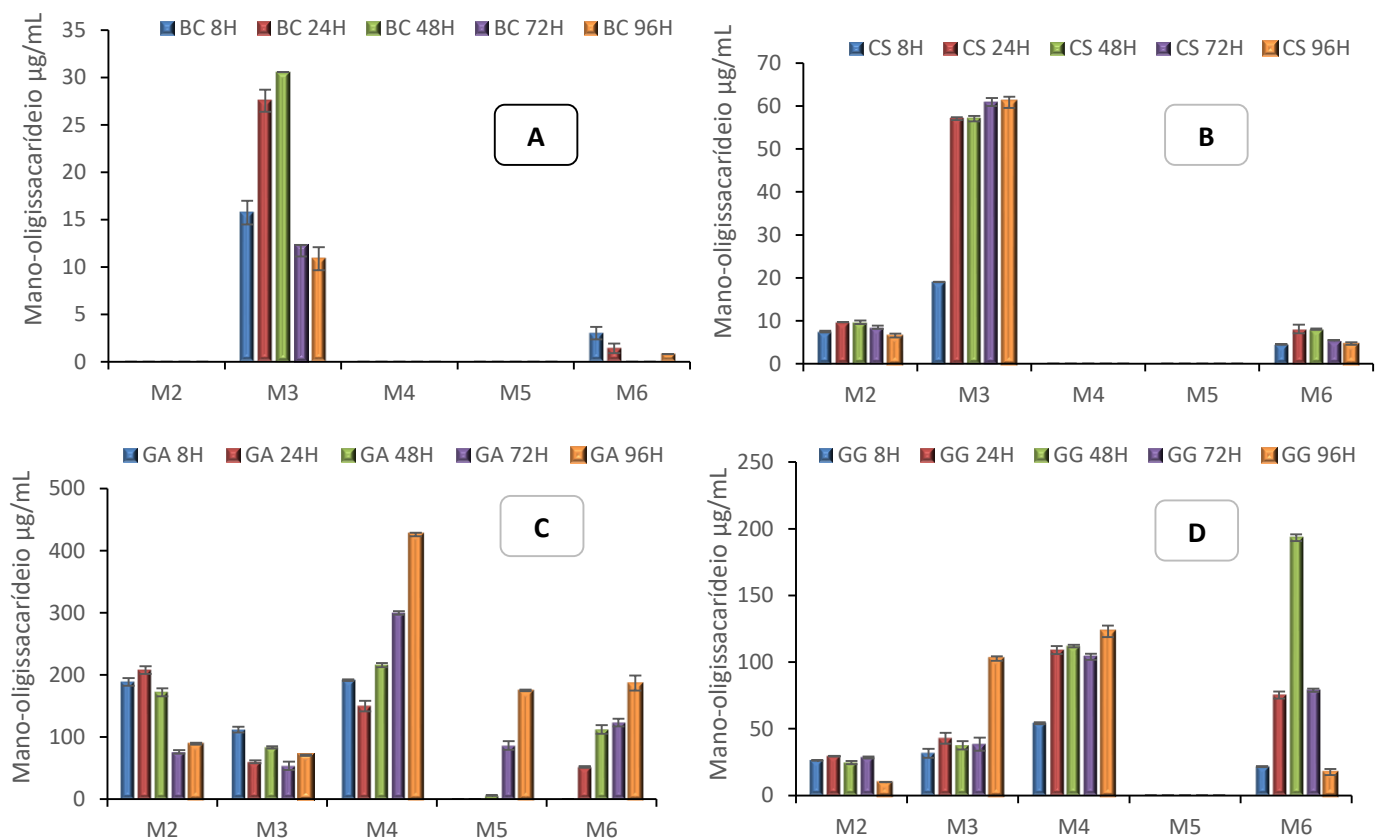


Figura 25. Identificação de mano-oligosacarídeos produzidos durante a hidrólise do bagaço de cana (A), casca de soja (B); goma de alfarroba (C); goma de guar (D); por enzimas presentes no EBC. Os oligossacarídeos identificados como M2, M3, M4, M5 e M6 são referentes a: manobiose, manotriose, manotetraose, manopentose e manohexaose.

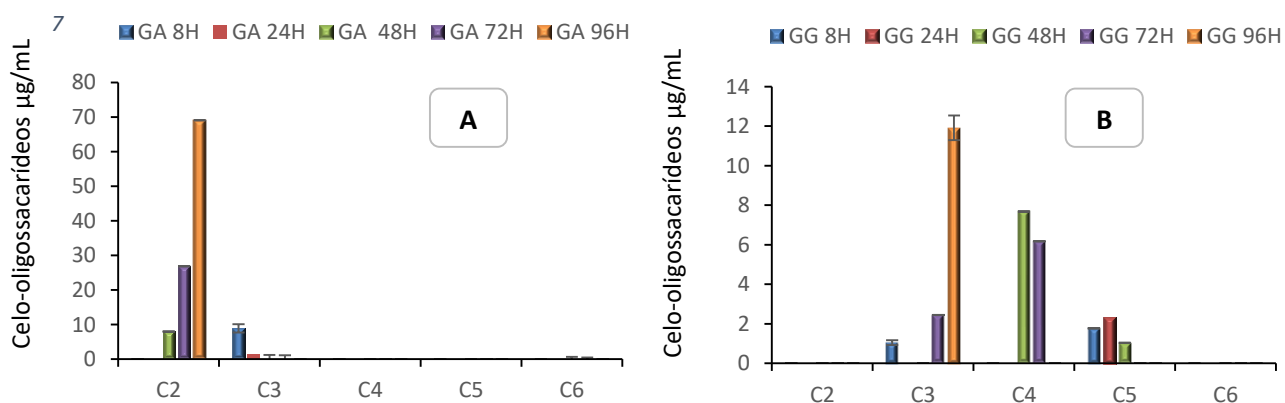


Figura 26. Identificação de cellobiosacarídeos produzidos durante a hidrólise da goma de alfarroba (A) e goma de guar (B) por enzimas presentes no EBC. Os oligossacarídeos identificados como C2, C3, C4, C5 e C6 são referentes a: celobiose, celotriose, celotetraose, celopentose e celohexaose.

Além dos mano-oligossacarídeos, teores de xilo-oligossacarídeos puderam ser detectados em todos os substratos utilizados para a sacarificação enzimática (Figura 27). Com exceção da goma de guar, no qual foram observados diferentes tipos de xilo-oligossacarídeos (xilotriose, xilopentose e xilohexaose), foi identificado somente xilotriose nas demais amostras. A identificação de xilo-oligossacarídeos torna incontestável a presença de endo-xilanases compondo o EBC. Contudo, a ausência de xilobiose nas amostras analisadas supostamente pode ter relação com a coeluição dos açúcares xilobiose e xilotriose e provavelmente não com a inexistência de xilosidases, uma vez que foi demonstrado anteriormente a presença de xilosidases compondo o EBC (Figura 22). A hipótese que ambos os xilo-oligômeros tenham coeluído ao longo das análises feitas no HPLC, pode ser consolidada quando avaliamos o tempo de retenção de ambos os xilo-oligômeros (dados não mostrados), enquanto o padrão de xilobiose foi eluído no tempo de retenção de 4,76 minutos, o padrão de xilotriose foi detectado em tempos de retenção muito próximos (4,75 minutos). Dessa forma, seriam necessários estudos que possam de fato separar ambos os oligossacarídeos a fim de confirmar a ausência ou não da xilobiose.

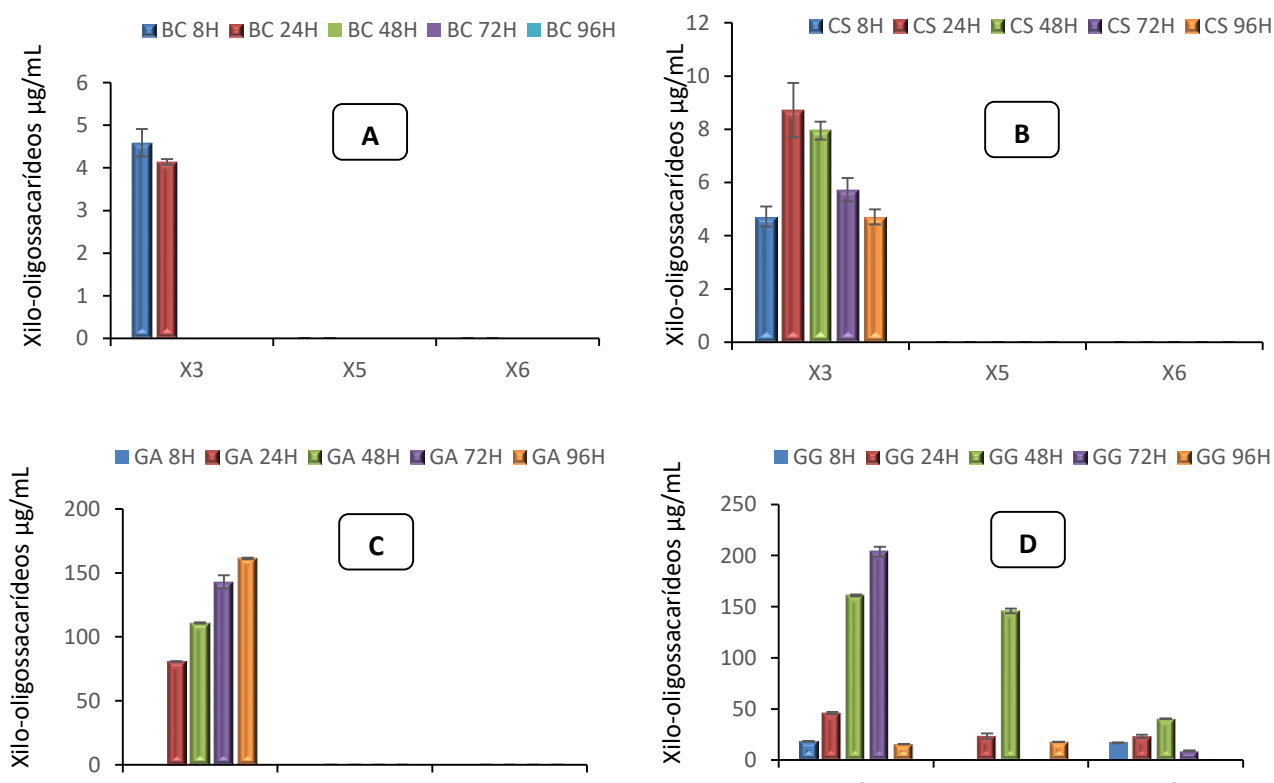


Figura 27. Identificação de xilo-oligossacarídeos produzidos durante a hidrólise do bagaço de cana (A), casca do grão de soja (B); goma de alfarroba (C); goma de guar (D); por enzimas presentes no EBC. Os oligossacarídeos X3, X4 e X6 são referentes a: xilotriose, xilotetraose e xilohexaose, respectivamente.

Ainda que grande parte da galactomananas seja composta por altas porcentagens de manose e galactose ($\approx 80\%$ segundo (Dionísio and Grenha 2012), pequenas quantidade de outros oligossacarídeos como a xilose e glicose podem ser identificados (Pinto 2019). Os teores de xilo-oligossacarídeos em ambos os substratos de galactomananas foram superiores as quantidades de celo-oligossacarídeos, especialmente quando consideramos a sacarificação da goma de guar que atingiu concentrações maiores que $200 \mu\text{g}$ no tempo de 72 horas de incubação. No entanto, ainda que proporções consideráveis de xilo-oligossacarídeos foram observadas como produtos finais da hidrólise, a alta taxa de mano-oligossacarídeos em ambos os substratos mostra que as enzimas do ECB são fontes promissoras de mananases.

No que se refere à análise dos monossacarídeos, a Figura 28 mostra os diferentes monossacarídeos observados nas amostras coletadas durante o período de 96 horas de sacarificação.

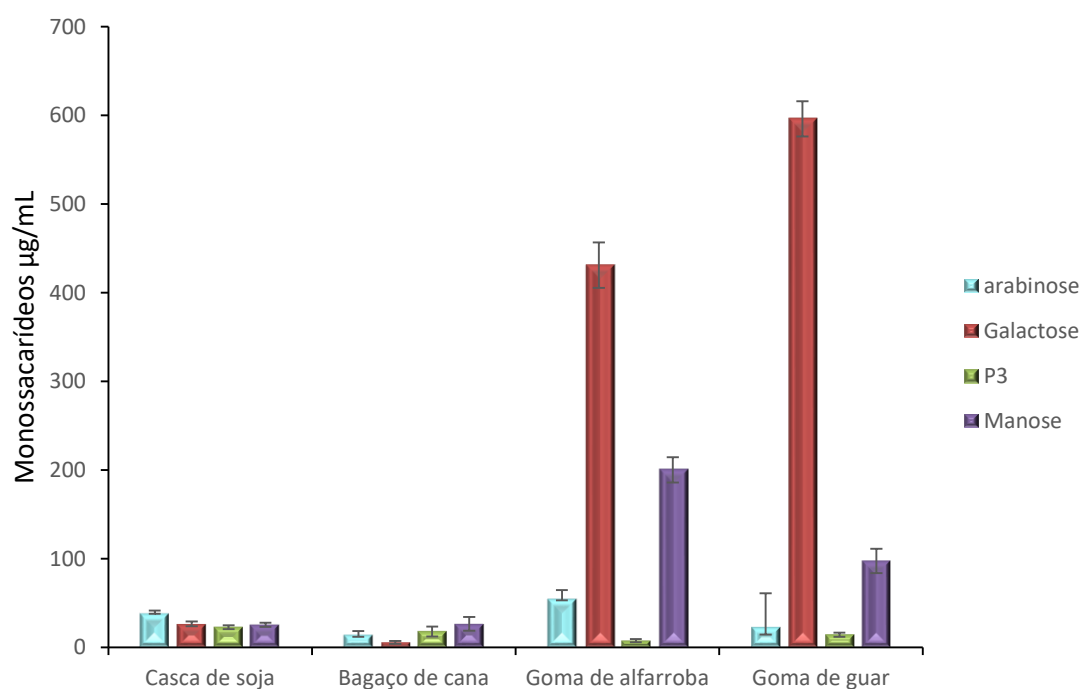


Figura 28. Identificação de monossacarídeos produzidos durante a hidrólise da casca se soja, bagaço de cana, goma de alfarroba e goma de guar. A mostra P3 refere-se à sobreposição do pico de glicose com xilose. Os produtos de hidrólise analisados por HPLC são referentes apenas ao tempo de incubação de 96 H.

A detecção de baixas quantidades de monossacarídeos observados para a casca do grão de soja e bagaço de cana correspondem com os resultados das altas quantidades de oligossarídeos identificados durante os diferentes tempos de hidrólise. Como já

mencionado anteriormente a complexidade da parede celular dos resíduos agroindustriais ainda é um desafio para a pesquisa. No entanto, o estudo da sacarificação enzimática contribui não só para a identificação dos componentes da parede celular vegetal, como também na predição das enzimas necessárias para a hidrólise enzimática. Os monossacarídeos notados para ambos os substratos lignocelulósicos foram a manose, arabinose e galactose. A sobreposição da glicose e xilose ao longo da corrida no HPLC impediu que esses açúcares pudessem ser identificados de forma separada, podendo então P3 ser tanto o monossacarídeo de glicose, quanto o monossacarídeo de xilose, ou até mesmo ambos os açúcares no mesmo pico.

De forma inesperada a taxa de manose para ambos os substratos de galactomananas, demonstra que mesmo com níveis insignificantes de β -mannosidases no EBC (Figura 22) quantidades consideráveis de manose foram liberadas durante a degradação dos substratos, sendo detectado um pouco mais de 200 μ g de manose na sacarificação da goma de alfarroba e 97 μ g desse açúcar na hidrólise da goma de guar. A alta concentração de galactose, evidencia a eficiência das β -galactosidases na remoção dos substituintes laterais de galactose e conseqüentemente em uma melhora no rendimento da hidrólise.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A identificação de mano-oligossacarídeos como os principais produtos avaliados em todos os tipos de resíduos, mostra que as enzimas predominantes no EBC produzidas por *Clonostachys byssicola* são as endo-mananases. Os mano-oligossacarídeos são potenciais produtos que podem ser utilizados como prébióticos. A maioria dos produtos utilizados como prébióticos atualmente são oriundos da parede celular de fungos, principalmente de *Sacharomices sp.*, que é constituída por baixas porcentagens de manose (Tanimoto et al. 2002). Todavia, pesquisas mostram que os mano-oligossacarídeos são mais eficientes porque em quantidades ínfimas (0,1-0,4 %) são capazes de melhorar o desempenho do crescimento de alguns animais, como aves e suínos. Tais compostos podem melhorar o sistema de defesa pré-intestinal, pois previnem colonização de organismos patógenos e regula o sistema imune (Liu et al. 2020b).

Dada a importância das enzimas que degradam os componentes hemicelulósicos secretadas por *Clonostachys byssicola*, o capítulo IV visa identificar as mananases secretadas pelo fungo, a fim de compreender as diferenças entre as mananases de *C.*

byssicola, em relação a mananases fúngicas descritas na literatura.

REFERÊNCIAS E BIBLIOGRAFIAS

- Adesina FC, Oluboyede OA, Onilude AA (2013) Production , purification and characterisation of a β - mannanase by *Aspergillus niger* through solid state fermentation (SSF) of *Gmelina arborea* shavings. *J Microbiol Res* 7:282–289 . doi: 10.5897/AJMR11.1106
- Anderson CT (2015) We be jammin ’: an update on pectin biosynthesis , trafficking and dynamics. *J Exp Bot* 67:495–502 . doi: 10.1093/jxb/erv501
- Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D (2013) Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 64:747–749 . doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105534
- Badhan AK, Chadha BS, Kaur J, Saini HS, Bhat MK (2007) Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresour Technol* 98:504–510 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.009
- Barcelos MCS, Ramos CL, Kuddus M, Rodriguez-Couto S, Srivastava N, Ramteke PW, Mishra PK, Molina G (2020) Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. *Biotechnol Lett* 42:1799–1827 . doi: 10.1007/s10529-020-02957-3
- Benocci T, Victoria M, Pontes A, Zhou M, Seiboth B, Vries RP De (2017) Biotechnology for Biofuels Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels* 10:1–25 . doi: 10.1186/s13068-017-0841-x
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99 . doi: 10.1002/elps.1150080203
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Broberg M, Dubey M, Sun MH, Ihrmark K, Schroers HJ, Li SD, Jensen DF, Durling MB, Karlsson M (2018) Out in the cold: Identification of genomic regions associated with cold tolerance in the biocontrol fungus *clonostachys rosea* through genome-wide association mapping. *Front Microbiol* 9:1–13 . doi: 10.3389/fmicb.2018.02844
- Buckeridge MS (2018) The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. *Biosystems* 164:112–120 . doi: 10.1016/j.biosystems.2017.10.003
- Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure , function , and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Res* 344:1879–1900 . doi: 10.1016/j.carres.2009.05.021
- Cain JA, Solis N, Cordwell SJ (2014) Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics* 97:265–286 . doi: 10.1016/j.jprot.2013.08.012
- Canteri MHG, Moreno L, Wosiack G, Scheer AP (2011) Pectina : da Matéria-Prima ao Produto Final. *Polímeros* 22:149–157 . doi: 10.1590/S0104-14282012005000024.
- Chambers MC, MacLean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, Gatto L, Fischer B, Pratt B, Egertson J, Hoff K, Kessner D, Tasman N, Shulman N, Frewen B, Baker TA, Brusniak MY, Paulse C, Creasy D, Flashner L, Kani K, Moulding C, Seymour SL, Nuwaysir LM, Lefebvre B, Kuhlmann F, Roark J, Rainer P, Detlev S, Hemenway T, Huhmer A, Langridge J, Connolly B, Chadick T, Holly K, Eckels J, Deutsch EW, Moritz RL, Katz JE, Agus DB, MacCoss M, Tabb DL, Mallick P (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* 30:918–920 . doi: 10.1038/nbt.2377
- Chatterton S, Punja ZK (2009) Chitinase and b -1 , 3-glucanase enzyme production by the

- mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Candian J Microbiol* 55:356–367 . doi: 10.1139/W08-156
- Chauhan PS, Gupta N (2017) Insight into microbial mannosidases: a review. *Crit Rev Biotechnol* 37:190–201 . doi: 10.3109/07388551.2015.1128878
- Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N (2012) Mannanases : microbial sources , production , properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1817–1830 . doi: 10.1007/s00253-012-3887-5
- Chen M, Wang J, Lin L, Wei W, Shen Y, Wei D (2021) High-level expression of a β -mannanase (manB) in *Pichia pastoris* GS115 for mannose production with *Penicillium brevicompactum* fermentation pretreatment of soybean meal. *Bioprocess Biosyst Eng* 44:549–561 . doi: 10.1007/s00449-020-02467-6
- Chen X, Cao Y, Ding Y, Lu W, Li D (2007) Cloning , functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* α -mannanase in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* 128:452–461 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.11.003
- Cherubini F (2010) The biorefinery concept : using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag* 51:1412–1421 . doi: 10.1016/j.enconman.2010.01.015
- Coffman AM, Li Q, Ju L-K (2014) Effect of natural and pretreated soybean hulls on enzyme production by *Trichoderma reesei*. *J Am Oil Chem Soc* 91:1331–1338 . doi: 10.1007/s11746-014-2480-8
- Corrêa CL (2016) Estudo do transcriptoma global do fungo *Aspergillus terreus* quando cultivado em resíduos agroindustriais. Universidade de Brasília
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850–861 . doi: 10.1038/nrm1746
- Cosgrove DJ (2014) Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr Opin Plant Biol* 22:122–131 . doi: 10.1016/j.pbi.2014.11.001
- de Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS (2013) Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Res* 6:564–579 . doi: 10.1007/s12155-012-9268-1
- Dence AW, Lin SY (1992) Genera, structural features of lignin. In: Timell TE (ed) *Methods in lignin chemistry*. Springer, Berlin, pp 1–17
- Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P (2004) Guar Seed β -Mannan Synthase Is a Member of the Cellulose Synthase Super Gene Family. *Science* (80-) 303:363–366 . doi: 10.1126/science.1090908
- Dionísio M, Grenha A (2012) Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *J Pharm Bioallied Sci* 4:175–185 . doi: 10.4103/0975-7406.99013
- Doherty WOS, Mousaviou P, Fellows CM (2011) Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind Crops Prod* 33:259–276 . doi: 10.1016/j.indcrop.2010.10.022
- Dunn MJ (2004) *Electroelution of proteins from polyacrylamide gels.*, Second Edi. Humana Press, Totowa
- Ferreira-Filho EX, Puls J, Coughlan MP (1993) Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *J Ind Microbiol* 11:171–180 . doi: 10.1007/BF01583719

- Florencio C, Colli A, Farinas S (2017) Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Quim Nova* 40:1082–1093 . doi: 10.21577/0100-4042.20170104
- Frazzetto G (2003) White biotechnology. *Sci Soc* 4:835–837 . doi: 10.1038/sj.embor.embor928
- Freiesleben P V, Spodsberg N, Blicher TH, Anderson L, Jorgensen H, Stalbrand H, Meyer AS, Krogh KBRM (2016) An *Aspergillus nidulans* GH26 endo- β -mannanase with a novel degradation pattern on highly substituted galactomannas. *Enzyme Microb Technol* 83:68–77
- Fry SC (2017) Plant Cell Wall Polymers. In: Love J, Bryant JA (eds) *Biofuels and bioenergy*, 1st edn. John Wiley & Sons, pp 59–87
- Gomes HAR, Moreira LRS, Júnior ACS, Fontes W, Santana RH, Kruger RH, Valle de Sousa M, Ricart CAO, Fereira-Filho EX (2020) Evaluation of different secretomes produced by *Clonostachys byssicola* as tools to holocellulose breakdown. *Int Biodeterior Biodegrad* 148:104880 . doi: 10.1016/j.ibiod.2019.104880
- Gu X, Lu H, Chen W, Meng X (2021a) Characterization of a novel thermophilic mannanase and synergistic hydrolysis of galactomannan combined with swollenin. *Catalysts* 11:1–11 . doi: 10.3390/catal11020254
- Gu X, Lu H, Zhang L, Meng X (2021b) A Thermophilic GH5 Endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and Its synergistic hydrolysis of mannan-containing polyssaccharides. *Catalysts* 11:2–13 . doi: 10.3390/catal11070862
- Gummadi SN, Panda T (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases * a re v iew. *Process Biochem* 38:987–996
- Guruprasad K, Reddy BVB, Pandit MW (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng Des Sel* 4:155–161 . doi: 10.1093/protein/4.2.155
- Hilge M, Gloor S, Winterhalter K, Zimmermann W, Piontek K (1996) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of two β -mannanase isoforms from *Thermomonospora fasca* KW3. *Acta Crystallogr* 52:1224–1225 . doi: 10.1107/S0907444996009006
- Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* (80-) 315:804–807 . doi: 10.1126/science.1137016
- Huang, Yao-Bing fu Y (2013) Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chem* 15:1095–1111 . doi: 10.1039/c3gc40136g
- Jana UK, Suryawanshi RK, Prajapati BP, Soni H, Kango N (2018) Production optimization and characterization of manno oligosaccharide generating B-mannanase from *Aspergillus oryzae*. *Bioresour Technol* 268:308–314 . doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.143
- Jaramillo PMD (2014) Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo. Universidade de Brasília
- Johnson LA, White PJ, Galloway R (2008) *Soybeans: chemistry, production, processing and utilization*, 1st edn. AOCS Press
- Jong E de, Jungmeier G (2015) Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In: Pandey A, Höfer R, Taherzadeh M, Nampoothiri KM, Larroche C (eds) *Industrial biorefineries & white biotechnology*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, p 710

- Kamm B, Kamm M (2004) Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:137–145 . doi: 10.1007/s00253-003-1537-7
- Karahalil E, Germec M, Karaoglan M, Yatmaz E, Coban HB, Inan M, Turhan I (2020) Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. *Biomass Convers Biorefinery* 10:1189–1205 . doi: 10.1007/s13399-019-00487-1
- Karlsson M, Amby DB, Lackner G, Lagopodi AL, Wang J, Kosawang C, Durling MB, Henrissat B, Choi J, Levasseur A, Vannacci G, Kamou N, Panteris E, Tzelepis GD, Zapparata A, Sarrocco S, Nygren K, Collinge DB, Dubey MK, Jensen B, Lee Y-H, Jensen DF, Hoffmeister D, Pöggeler S (2015) Insights on the Evolution of Mycoparasitism from the Genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biol Evol* 7:465–480 . doi: 10.1093/gbe/evu292
- Karp SG, Rozhkova AM, Semenova M V., Osipov DO, de Pauli STZ, Sinitsyna OA, Zorov IN, de Souza Vandenberghe LP, Soccol CR, Sinitsyn AP (2021) Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. *Bioresour Technol* 330:124888 . doi: 10.1016/j.biortech.2021.124888
- Kim D (2018) Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose : Inhibitor Effects and Detoxification Strategies : A Mini Review. *Molecules* 23:2–21 . doi: 10.3390/molecules23020309
- Kou Q, Xun L, Liu X (2016) TopPIC: A software tool for top-down mass spectrometry-based proteoform identification and characterization. *Bioinformatics* 32:3495–3497 . doi: 10.1093/bioinformatics/btw398
- Kubicek CP (2013) The plant biomass. In: Kubicek CP (ed) *Fungi and Lignocellulosic Biomass*, 1st edn. Joh Wiley & Sons, Iowa, pp 1–11
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685 . doi: 10.1038/227680a0
- Lermyte F, Sobott F (2015) Electron transfer dissociation provides higher-order structural information of native and partially unfolded protein complexes. *Proteomics* 15:2813–2822 . doi: 10.1002/pmic.201400516
- Li M, Cao S, Meng X, Studer M, Wyman CE, Ragauskas AJ, Pu Y (2017a) The effect of liquid hot water pretreatment on the chemical-structural alteration and the reduced recalcitrance in poplar. *Biotechnol Biofuels* 10:1–13 . doi: 10.1186/s13068-017-0926-6
- Li M, Yoo CG, Pu Y, Biswal AK, Mohnen D, Ragauskas AJ, Tolbert AK (2019) Downregulation of pectin biosynthesis gene GAUT4 leads to reduced ferulate and lignin-carbohydrate cross-linking in switchgrass. *Commun Biol* 2:1–11 . doi: 10.1038/s42003-018-0265-6
- Li Q, Loman A Al, Coffman AM, Ju L-K (2017b) Soybean hull induced production of carbohydrases and protease among *Aspergillus* and their effectiveness in soy flour carbohydrate and protein separation. *J Biotechnol* 248:1–8
- Liao H, Li S, Zheng H, Wei Z, Liu D, Raza W, Shen Q (2014) A new acidophilic thermostable endo-1, 4- β -mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2 : cloning , characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* 14:1–12 . doi: 10.1186/s12896-014-0090-z
- Liu HM, Wang FY, Liu YL (2016) Hot-compressed water extraction of polysaccharides from soy hulls. *Food Chem* 202:104–109 . doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.129
- Liu Y, Lei F, He L, Xu W, Jiang J (2020a) Comparative study on the monosaccharides of three

- typical galactomannans hydrolyzed by different methods. *Ind Crops Prod* 157: . doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112895
- Liu Z, Ning C, Yuan M, Fu X, Yang S, Wei X, Xiao M, Mou H, Zhu C (2020b) High-efficiency expression of a superior β -mannanase engineered by cooperative substitution method in *Pichia pastoris* and its application in preparation of prebiotic mannoooligosaccharides. *Bioresour Technol* 311:123482 . doi: 10.1016/j.biortech.2020.123482
- Liu Z, Ning C, Yuan M, Yang S, Wei X, Xiao M, Fu X, Zhu C, Mou H (2020c) High-level expression of a thermophilic and acidophilic β -mannanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with significant potential in mannoooligosaccharide preparation. *Bioresour Technol* 295:122257 . doi: 10.1016/j.biortech.2019.122257
- Lu H, Luo H, Shi P, Huang H (2014) A novel thermophilic endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3 : functional roles of carbohydrate-binding module and Thr / Ser-rich linker region. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2155–2163 . doi: 10.1007/s00253-013-5112-6
- Lu H, Luo H, Shi P, Huang H, Meng K, Yan P, Yao B (2013) A novel thermophilic endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3 : functional roles of carbohydrate-binding module and Thr / Ser-rich linker region. *Biotechnol Relev Enzym Proteins* 98:2155–2163 . doi: 10.1007/s00253-013-5112-6
- Luo H, Wang Y, Wang H, Yang J, Yang Y, Huang H, Yang P, Bai Y, Shi P, Fan Y, Yao B (2009) A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: Gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:453–461 . doi: 10.1007/s00253-008-1766-x
- Ma L, Jiang H, Li W, Qin H, Lv Z, Huang J, Hou X, Wang W (2021) Biochemical properties of a native β -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus* QH1 and partial characterization of its N-glycosylation. *Biochem Biophys Reports* 26:100922 . doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100922
- Macgregor EA (2005) An overview of clan GH-H and distantly-related families. *Biologia (Bratisl)* 16:5–12
- Mäkelä MR, Aguilar-Pontes MV, Van Rossen-Uffink D, Peng M, De Vries RP (2018) The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA. *Sci Rep* 8:1–8 . doi: 10.1038/s41598-018-25152-x
- Mäkelä MR, Bouzid O, Robl D, Post H, Peng M, Heck A, Altelaar M, de Vries RP (2017) Cultivation of *Podospora anserina* on soybean hulls results in efficient enzyme cocktail for plant biomass hydrolysis. *N Biotechnol* 37:1–10
- Mäkelä MR, Donofrio N, Vries RP De (2014) Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genet Biol* 72:2–9 . doi: 10.1016/j.fgb.2014.08.010
- Malgas S, Thoresen M, van Dyk JS, Pletschke BI (2017) Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol* 103:1–11 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.04.007
- Marco JI da C, Souza-Neto GP, Castro CFS, Michelin M, Polizeli MDLTM, Ferreira-Filho EX (2015) Partial Purification and Characterization of a Thermostable β -Mannanase from *Aspergillus foetidus*. *Appl Sci* 5:881–893 . doi: 10.3390/app5040881
- Mielenz JR, Bardsley JS, Wyman CE (2009) Bioresource Technology Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour Technol* 100:3532–3539 . doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.044
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.

Anal Chem 31:426–428

- Mistry V V, Maubois J (2017) Application of Membrane Separation Technology to Cheese Production. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett D w (eds) Cheese, 4th edn. Elsevier Ltd, pp 677–697
- Montibeller VW (2015) Mananase: produção por via convencional e recombinante e obtenção de produto formulado líquido. Universidade Federal do Paraná
- Moreira GM (2016) DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Clonostachys* NO BRASIL LAVRAS - MG. Universidade Federal de Lavras
- Moreira GM, Abreu LM, Carvalho VG, Schroers HJ, Pfenning LH (2016) Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycol Prog* 15:1031–1039 . doi: 10.1007/s11557-016-1224-6
- Moreira LRS, Filho EXF (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:165–178 . doi: 10.1007/s00253-008-1423-4
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012a) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: Show K-Y, Guo X (eds) Industrial Waste, 1st edn. InTech, Rijeka, p 274
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012b) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: Industrial waste. pp 121–140
- Nadaroglu H, Dikbas N (2018) Purification and Characterization of Linamarase from *Lactobacillus Plantarum*. *J Bacteriol Mycol* 4:1–6 . doi: 10.26420/jbacteriolmycol.2017.1045
- Nevalainen H, Peterson R (2014) Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much ? *Front Microbiol* 5:1–10 . doi: 10.3389/fmicb.2014.00075
- Obembe OO, Jacobsen E, Visser RGF, Vincken J-P (2006) Cellulose-hemicellulose networks as target for in planta modification of the properties of natural fibres. *Biotechnol Mol Biol Rev* 1:76–86
- Ochoa-villarreal M, Aispuro-hernández E, Vargas-Arispu I, Martínez-Téllez MÁ (2012) Plant Cell Wall Polymers : Function , Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In: Gomes A de S (ed) Polymerization, 1st edn. Intechopen
- Ostergaad LH, Olsen HS (2011) Industrial Applications of Fungal Enzymes. In: Hofrichter M (ed) Industrial applicatioons, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg, pp 269–290
- Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G (2013) Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238:627–642 . doi: 10.1007/s00425-013-1921-1
- Pauly M, Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J* 54:559–568 . doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x
- Penido A, Mendes P, Campos I, Mendes L (2020) Malaysian Journal of Microbiology. *Malays J Microbiol* 16:396–406 . doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose , hemicellulose and lignin : an overview. *Int Microbiol* 5:53–63 . doi: 10.1007/s10123-002-0062-3
- Pinto ASB (2019) Efeito gastroprotetor da gom guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e galactomanana da fava danta (*dimorphandra gardneriana*) na gastrite experimental

induzida por álcool. Universidade do Ceará

- Polleto P (2015) Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo. Universidade e Caxias do Sul
- Ponnuasamy VK, Nguyen DD, Dharmaraja J, Shobana S, Banu JR, Saratale RG, Chang SW, Kumar G (2019) A review on lignon structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour Te* 271:462–472 . doi: 0.1016/j.biortech.2018.09.070
- Popper ZA (2008) Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* 11:286–292 . doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.012
- Purchart V, Vrsanská M, Svoboda P, Pohl J, Ögel ZB, Biely P (2004) Purification and characterization of two forms of endo- α -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochim Biophys Acta* 1674:239–250 . doi: 10.1016/j.bbagen.2004.06.022
- Qin L, Li WC, Liu L, Zhu JQ, Li X, Li BZ, Yuan YJ (2016) Inhibition of lignin - derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnol Biofuels* 9:1–10 . doi: 10.1186/s13068-016-0485-2
- Reiter W-D (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 5:536–542 . doi: 10.1016/S1369-5266(02)00306-0
- Robles Barros PJ, Ramirez Ascheri DP, Siqueira Santos ML, Morais CC, Ramirez Ascheri JL, Signini R, dos Santos DM, de Campos AJ, Alessandro Devilla I (2020) Soybean hulls: Optimization of the pulping and bleaching processes and carboxymethyl cellulose synthesis. *Int J Biol Macromol* 144:208–218 . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.074
- Rocha HELDER A, Silva AJ, Gómez-mendoza DP, Santos Junior ACM, Cologna NM, Almeida RoM, Sousa M v, Ricart CAO, Ferreira-Filho EX (2017) Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys bysicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. *J Biotechnol* 254:51–58 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.001
- Rodrigues SLc, Moreira RLDS, Cardoso MH, Merçon F (2003) AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ULTRAFILTRAÇÃO DE SUCO DE BANANA 1. *Food Sci Technol* 23:98–101
- Rodríguez MM (2016) Lignin biomass conversion into chemicals and fuels. Technical University of Denmark
- Rojas MJ (2012) Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja. Universidade Federal de São Carlos
- Roy MD, Peterson ME, Danson MJ, Price NC, Kelly SM, Monk CR, Weinberg CS, Oudshoorn ML, Lee CK (2010) The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemistry* 425:353–360 . doi: 10.1042/BJ20091254
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour Bioprocess* 5:1–15 . doi: 10.1186/s40643-017-0187-z
- Sakai K, Mochizuki M, Yamada M, Shinzawa Y, Minezawa M, Kimoto S, Murata S, Kaneko Y, Ishihara S, Jindou S, Kobayashi T, Kato M, Shimizu M (2017) Biochemical characterization of thermostable β -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3237–3245 . doi: 10.1007/s00253-017-8107-x
- Saraiva RM, M PEF De, Borges ÁV (2014) USO E PERSPECTIVA DE *Clonostachys rosea*

COMO AGENTE DE BIOCONTROLE USE AND PROSPECT OF *Clonostachys rosea* as A BIOCONTROL AGENT. *Rev Ciências Agrícolas* 31:78–91

- Schroers AH, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W, Samuels J, Seifert KA (1999) Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other fungi. *Mycologia* 91:365–385
- Schroers H (2001) A monograph of *Bionectria* and its *Clonostachys* anamorphs. Centraalbureau voor Schimmelcultuur
- Sciuto DL (2017) Cellulose-degrading enzyme production by *Clonostachys byssicola*: Partial purification and characterization of an endoglucanase. *Mycosphere* 8:415–431 . doi: 10.5943/mycosphere/8/3/4
- Sciuto D Lo (2015) Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase. Universidade de Brasília
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219–228 . doi: 10.1016/S1369-5274(03)00056-0
- Sharma M, Sangwan RS, Khatkar BS, Singh SP (2021) Development of a Prebiotic Oligosaccharide Rich Functional Beverage from Sweet Sorghum Stalk Biomass. *Waste and Biomass Valorization* 12:2001–2012 . doi: 10.1007/s12649-020-01156-5
- Sharma S, Vaid S, Bhat B, Singh S, Bajaj BK (2019) Thermostable enzymes for industrial biotechnology. In: Singh RS, Singhania RR, Pandey A, Larroche C (eds) *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier B.V., pp 469–495
- Sheng Y, Lam SS, Wu Y, Ge S, Wu J, Cai L, Huang Z, Le Q Van, Sonne C, Xia C (2021) Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresour Technol* 324: . doi: 10.1016/j.biortech.2020.124631
- Shimizu M, Kaneko Y, Ishihara S, Mochizuki M, Sakai K, Yamada M, Murata S, Itoh E, Yamamoto T, Sugimura Y, Hirano T, Takaya N, Kobayashi T, Kato M (2015) Novel α -1,4-Mannanase Belonging to a New Glycoside Hydrolase Family in *Aspergillus nidulans* *. *J Biol Chem* 290:27914–27927 . doi: 10.1074/jbc.M115.661645
- Silva C de OG, Santos Júnior A de CM, Santana RH, Krüger RH, Fontes W, de Sousa MV, Ricart CAO, Ferreira Filho EX (2019) Mild hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse enhances the production of holocellulases by *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:1517–1529 . doi: 10.1007/s10295-019-02207-0
- Silva CD, Kazama R, Faustino JO, Zambom A, Santos GT, Branco AF (2004) Digestibilidade in vitro e degradabilidade in situ da casca do grão de soja, resíduo de soja e casca de algodão. *Anim Sci* 26:501–506
- Silva COG, Ribeiro JA de A, Souto AL, Abdelnur PV, Batista LR, Rodrigues KA, Parachin NS, Filho EXF (2018) Sugarcane Bagasse Hydrothermal Pretreatment Liquors as Suitable Carbon Sources for Hemicellulase Production by *Aspergillus niger*. *Bioenergy Res* 11:316–329 . doi: 10.1007/s12155-018-9898-z
- Silva COG, Vaz RP, Ferreira-Filho EX (2017) Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 12:277–289 . doi: 10.1002/bbb.1832
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS (2011a) Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. *Phytochemistry* 72:2352–2360 . doi:

- 10.1016/j.phytochem.2011.08.020
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS (2011b) O revestimento das samambaias. São Paulo
- Sluiter A, Hames R, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Tepleton D, Crocker D (2008a) Determination of structural carbohydrates and Lignin in biomass. Tech Rep NREL
- Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D (2008b) Chirurgie des métastases pulmonaires des cancers colorectaux : facteurs prédictifs de survie. Tech Rep NREL 0:0
- Soni H, Kumar H, Brett R, Naveen IP (2016) Purification and characterization of β -mannanase from *Aspergillus terreus* and its applicability in depolymerization of mannans and saccharification of lignocellulosic biomass. *3 Biotech* 6:1–11 . doi: 10.1007/s13205-016-0454-2
- Soni H, Rawat HK, Ahirwar S, Kango N (2017) Screening , statistical optimized production , and application of β -mannanase from some newly isolated fungi. *Eng Life Sci* 17:392–401 . doi: 10.1002/elsc.201600136
- Souza WR, Maitan-alfenas, Gabriela P Gouvêa PF, Brown NA, Savoldi M, Battaglia E, Goldman MHS, de Vries RP, Goldman GH (2013) The influence of *Aspergillus niger* transcription factors AraR and XlnR in the gene expression during growth in D -xylose , L -arabinose and steam-exploded sugarcane bagasse. *Fungal Genet Biol* 60:29–45 . doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.007
- Srivastava PK, Kapoor M (2017) Production , properties , and applications of endo - β -mannanases. *Biotechnol Adv* 35:1–19 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.001
- Sticklen MB (2008) Plant genetic engineering for biofuel production : towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* 9:433–443 . doi: 10.1038/nrg2336
- Tanimoto T, Ikuta A, Sugiyama M, Koizumi K (2002) HPLC analysis of manno-oligosaccharides derived from *Saccharomyces cerevisiae* mannan using an amino column or a graphitized carbon column. *Chem Pharm Bull* 50:280–283 . doi: 10.1248/cpb.50.280
- Tejirian A, Xu F (2010) Inhibition of Cellulase-Catalyzed Lignocellulosic Hydrolysis by Iron and Oxidative Metal Ions and Complexes □. *Appl Environ Microbiol* 76:7673–7682 . doi: 10.1128/AEM.01376-10
- Thomas LH, Forsyth VT, Adriana Š, Kennedy CJ, May RP, Altaner CM, Apperley DC, Wess TJ, Jarvis MC (2013) Structure of Cellulose Micro fibrils in Primary Cell Walls. *Plant Physiol* 161:465–476 . doi: 10.1104/pp.112.206359
- Tian Y, Jiang Y, Ou S (2013) Interaction of cellulase with three phenolic acids. *Food Chem* 138:1022–1027 . doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.129
- Toro-trochez JL, Carrillo-pedraza ES, Bustos-Martínez D, García-mateos FJ, Ruiz-Rosas RR, Rodríguez-Mirasol J, Cordero T (2019) Thermogravimetric characterization and pyrolysis of soybean hulls. *Bioresour Technol Reports* 6:183–189 . doi: 10.1016/j.biteb.2019.02.009
- Uechi K, Watanabe M, Fujii T, Kamachi S, Inoue H (2020) Identification and Biochemical Characterization of Major β -Mannanase in *Talaromyces cellulolyticus* Mannanolytic System. *Appl Biochem Biotechnol* 192:616–631 . doi: 10.1007/s12010-020-03350-6
- Uenojo M, Pastore M (2007) Revisão. *Quim Nova* 30:388–394
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin Biosynthesis and Structure 1. *Plant Physiol* 153:895–905 . doi: 10.1104/pp.110.155119
- Vasconcellos VM, Tardioli PW, Giordano RLC, Farinas CS (2016) Addition of metal ions to

- (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *N Biotechnol* 33:331–337
- Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, Beldman G, Visser RGF, Voragen AGJ (2003) Pectin the hairy thing. In: Voragen F, Schols H, Visser R (eds) *Advances in Pectin and Pectinase Research*, 1st edn. Springer, Dordrecht, pp 47–61
- Visser EM, Falkoski DL, de Almeida MN, Maitan-Alfenas GP, Guimarães VM (2013) Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 144:587–594 . doi: 10.1016/j.biortech.2013.07.015
- Voragen AGJ, Coenen G-J, Verhoef RP, Schols HA (2009) Pectin , a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem* 20:263–275 . doi: 10.1007/s11224-009-9442-z
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol Adv* 23:115–129 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.11.001
- Wang NN, Liu J, Li YX, Ma JW, Yan QJ, Jiang ZQ (2021) High-level expression of a glycoside hydrolase family 26 β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for production of partially hydrolysed fenugreek gum. *Process Biochem* 100:90–97 . doi: 10.1016/j.procbio.2020.09.034
- Wessel D, Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141–143 . doi: 10.1016/0003-2697(84)90782-6
- Whistler RL (2012) Hemicelluloses. In: *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives: Third Edition*. pp 295–308
- Wingfield MJ, Beer ZWDE, Slippers B, Wingfield BD, Groenewald JZ, Lombard L, Crous PW (2012) One fungus , one name promotes progressive plant pathology. One fungus, one name *Promot Progress plant Pathol* 13:604–613 . doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00768.X
- Xie J, Pan L, He Z, Liu W, Zheng D, Zhang Z, Wang B (2020) A novel thermophilic β -mannanase with broad-range pH stability from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic effect with α -galactosidase on hydrolyzing palm kernel meal. *Process Biochem* 88:51–59 . doi: 10.1016/j.procbio.2019.09.029
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2010) Enzyme and Microbial Technology Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol* 46:170–176 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.11.001
- Ximenes EA, Chen H, Kataeva IA, Cotta MA, Felix CR, Ljungdahl LG, Li X (2005) A mannanase , ManA , of the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* sp . strain PC-2 has carbohydrate binding and docking modules. *J Microbiol* 51:559–568 . doi: 10.1139/W05-033
- Xin D, Ge X, Sun Z, Viikari L, Zhang J (2015) Competitive inhibition of cellobiohydrolase I by manno-oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* 68:62–68 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.09.009
- Yang H, Shi P, Lu H, Wang H, Luo H, Huoqing H, Yang P (2015) A thermophilic β -mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 with broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers. *Food Chem* 173:283–289
- York WS, Darvill AG, McNeil M, Stevenson TT, Albersheim P (1986) Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol* 118:3–40

. doi: 10.1016/0076-6879(86)18062-1

Yu S, Li Z, Wang Y, Chen W, Fu L, Tang W, Chen C (2015) High-level expression and characterization of a thermophilic β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 37:1853–1859 . doi: 10.1007/s10529-015-1848-7

Zhang J, Zhou H, Liu D, Zhao X (2019) Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose, 1st edn. Academic Press

CAPÍTULO IV

**Estratégias utilizadas
visando o isolamento e
identificação de
mananases de
*Clonostachys byssicola***

INTRODUÇÃO

A identificação de espécies de *Clonostachys* por Schroers em 2001 impulsionou diversos grupos a intensificarem estudos pela busca de novas linhagens a fim de se conhecer o potencial destes microrganismos como agente de controle biológico. Apenas no Brasil foram caracterizadas mais de 50 isolados, no qual a separação exata a nível de espécie só pode ser realizada quando utilizada análises biomoleculares conhecida como multilocus (Moreira et al. 2016). Dentre os isolados analisados, mais de 9 espécies de *C. byssicola* puderam ser descritas, sendo representados por isolados obtidos a partir de amostras de solo, associados a plantas ou como micoparasitas.

A capacidade de *C. byssicola* em atuar como agente de controle biológico é uma das principais características destacadas na literatura. Contudo, a avaliação de diferentes secretomas produzidos por *C. byssicola* quando crescido em fontes de carbono compostas por resíduos lignocelulósicos mostrou que a espécie é responsável por produzir glicosil hidrolases de diferentes famílias (Gomes et al. 2020).

A demanda por enzimas microbianas para aplicações industriais intensificou a busca por microrganismos que fossem capazes de secretar diversos tipos de enzimas. A utilização de mananases em indústrias de rações, alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos e na bioconversão de resíduos lignocelulósicos tem crescido anualmente (Nadaroglu e Dikbas 2018). A produção de mananases pelos microrganismos é um processo natural como parte do seu metabolismo. Contudo, baixos níveis de expressão são alcançados pela produção *in natura* pela maioria dos microrganismos. Uma estratégia utilizada para aumentar o rendimento na produção de enzimas é a expressão heteróloga. A expressão heteróloga além de aumentar a produção de enzimas é responsável por diminuir a quantidade de proteases secretadas pelos microrganismos, evitando perdas no rendimento final da produção de enzimas (Wang et al. 2005)

O sequenciamento do genoma de *C. rosea* por Karlsson et al. (2015) revelou a presença de um conjunto de genes relacionados com a degradação dos polissacarídeos presente na parede celular vegetal. Em consequência da inexistência de estudos sobre o sequenciamento genômico de *C. byssicola*, o banco de dados elaborado por Karlsson e colabores (2015) foi utilizado para a identificação de mananases com sequências similares as sequências identificadas por espectrometria de massas.

OBJETIVO

Isolar e identificar as diferentes mananases expressas por *Clonostachys byssicola*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar parcialmente mananases presentes no extrato bruto concentrado;
- Identificar as sequências de mananases por espectrometria de massas e por sequenciamento do cDNA;
- Expressar mananases identificados em *Komagataella pastoris*.

MÉTODOS

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE MANANASES

As tentativas de purificar as mananases presentes no extrato bruto concentrado foram realizadas seguindo duas estratégias gerais. Na primeira estratégia, foi utilizada a combinação de dois estágios sucessivos de cromatografia de troca aniônica em pH 7 (Figura 29-A). Enquanto na segunda estratégia, combinações de cromatografias catiônicas e aniônicas foram usadas conforme representado na Figura 29-B.

ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO #1:

As amostras concentradas por ultrafiltração foram submetidas à cromatografia de troca aniônica do tipo Q *Sepharose Fast Flow* (2,6 x 6 cm) (*Amersham Biosciences AB*, Uppsala, Suécia) (Figura 29-A). A coluna foi previamente lavada com água destilada e equilibrada com tampão 50 mM de fosfato de sódio pH 7,0 contendo 0,01% de azida sódica. Foram aplicados 30 mL de amostra na coluna, coletando frações de 5 mL, e eluídas com um fluxo de 0,33 mL/min. A eluição foi realizada em tampão 50 mM de fosfato de sódio pH 7,0 e por meio de um gradiente de NaCl de 0 a 50mM. As frações cromatográficas foram analisadas por microensaios enzimáticos para a detecção das atividades de mananase, CMCcase, xilanase e pectinase.-

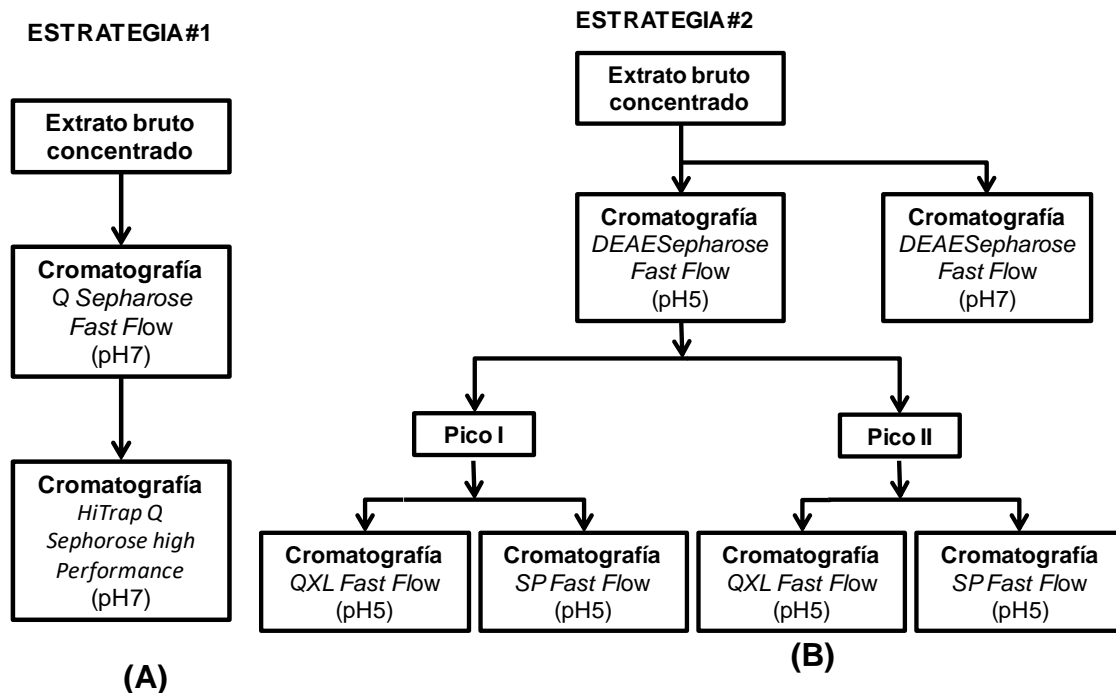


Figura 29. Estratégias cromatográficas utilizadas na purificação parcial das mananases de *Clonostachy byssicola*. Na primeira estratégia (A) foram utilizadas duas etapas de cromatografia de troca aniônica forte de tipo Q Sheparose com diferentes tipos de matriz a pH 7. Na estratégia #2, o extrato bruto foi cromatografado em troca aniônica do tipo DEAE utilizando os pH 5 e 7. As duas frações de proteínas com atividade de mananase eluídas em pH 5, foram subsequentemente cromatografadas em trocas aniônica (QXL) e catiônica (SP) no mesmo pH. As frações de proteínas eluídas foram analisadas por atividades enzimáticas, SDS-PAGE e espalhamento dinâmico da luz (DLS).

As frações contendo atividade de mananases foram coletadas (fração QFF PICO3) e aplicadas em coluna de troca aniônica do tipo *HiTrap Q Sepharose high Performance* (Q HP 1 mL) acoplada ao sistema de purificação *Äkta* (GE Helthcare). A priori, a coluna foi lavada com água mili-Q, e seguidamente equilibrada com tampão 50 mM de fosfato de sódio pH 7. Foi aplicado 1 mL de amostra enzimática na coluna e frações de 1 mL foram coletadas com um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi realizada em tampão 50 mM de fosfato de sódio pH 7,0 por meio de um gradiente de NaCl de 0 a 50 mM. A fração contendo atividade de mananase (QHP12) foi utilizada para posterior caracterização. O perfil de proteína total foi determinado pela leitura das frações no comprimento de onda de 280 nm em Spectramax M2 (*Molecular Devices*). As frações de proteínas obtidas por esta estratégia foram utilizadas em análises de identificação, espectrometria de massas e biologia molecular.

ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO #2:

As frações do extrato bruto concentrado por ultrafiltração foram ajustadas aos pHs 7,0 e 5,0 com tampões a 50 mM de fosfato de sódio e 20 mM de acetato de sódio, respectivamente. Uma quantidade de 35 mL do EBC foi preparado e diluído afim de diminuir a condutância e manter a mesma concentração de proteínas quando submetidas à cromatografia de troca aniônica do tipo DEAE *Sepharose Fast Flow* (2,6 x 6 cm) (*Amersham Biosciences AB*, Uppsala, Suécia) (Figura 29-B). As eluições das proteínas foram realizadas em gradiente linear de NaCl de 20 mM até 400 mM, em um fluxo de 3 mL/min, coletando frações de 5 mL utilizando os correspondentes tampões. As duas frações de proteínas com atividade mananase (Pico I e Pico II) foram aplicadas em colunas de trocas aniônica (QXL fast flow, *GE Healthcare*, EUA) e catiônica (SP fast flow, *GE Healthcare*, EUA) no tampão acetado de sódio pH 5,0 (Figura 29-B). Todas as etapas cromatográficas foram realizadas no sistema *ÄKTA prime* (*GE Healthcare*, EUA) a um fluxo de 2 mL/min, fações de proteínas coletadas de 3 mL, e os valores de absorvância a 280 nm, pH e condutividade foram monitorados. A composição proteica das amostras foi avaliada por gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 15%) e as atividades enzimáticas foram avaliadas. As frações de proteínas eluidas das cromatografias de QXL e SP foram adicionalmente analisadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*).

ELETROFORESE E ZIMOGRAFIA

O grau de pureza das amostras enzimáticas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, conforme descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram previamente submetidas a precipitação em solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% e incubadas a 4°C por 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 min a 4°C; o sobrenadante foi removido e as amostras foram lavadas 3 vezes com 1 mL de acetona refrigerada e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram submetidas a secagem na temperatura ambiente.

As amostras enzimáticas precipitadas foram ressuspensas em tampão de amostra 1x (Tris-HCL 125 mM pH 6,8; SDS 2,0%; azul de bromofenol 0,05%; glicerol 20% e β -mercaptoetanol 5,0%) e aquecidas por 3 min a 100 °C, em seguida foram submetidas à

eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

A visualização de proteínas foi realizada por coloração com nitrato de prata. O gel foi incubado em uma solução fixadora (v/v de metanol 40 % e ácido acético 12 %) durante o período de 1 h, posteriormente o gel foi lavado três vezes com etanol 50% (v/v) e incubado por 1 min em solução de tiosulfato de sódio 0,02% (m/v). A solução de tiosulfato foi removida por lavagens sucessivas em água destilada. O gel foi incubado por 15 min em solução de 0,2% (m/v) de nitrato de prata contendo 0,074% (v/v) de formaldeído (lavado três vezes com água destilada) e mantido em solução reveladora 6% (m/v) de carbonato de sódio, 0,0004 (v/v) de tiosulfato e 0,05% (v/v) de formaldeído). A reação foi interrompida pela adição de solução fixadora (Blum, Beier e Gross 1987).

Para realização do zimograma, o gel foi copolimerizado com o substrato (manana 1%) em uma concentração final de 0,1% do substrato. As amostras foram precipitadas com TCA e ressuspensas em tampão de amostra, como descrito anteriormente. Após a corrida, o gel foi incubado 2 vezes em solução Triton 100x 2,5% por 30 min para a renaturação das proteínas, a posteriori o gel foi incubado em solução de acetato de sódio (50 mM) pH 5,5 por duas vezes durante 30 min e mantido no mesmo tampão por 1h e 30 min a 50 °C. A reação foi interrompida por incubação do gel em câmara fria por 30 min, por fim o gel foi revelado em solução de vermelho congo 1% e descorado em solução 1M de NaCl e ácido acético 0,5%.

IDENTIFICAÇÃO DE MANANASES

DIGESTÃO EM GEL

A fração com atividade de mananase, eluída durante o gradiente (QFFP), foi aplicada em gel SDS-PAGE e corado com comassie blue, uma vez identificada a banda correspondente à mananase esta foi excisada do gel com o auxílio de um bisturi e submetida a um processo de digestão com tripsina e identificada por LC-MS/MS.

Primeiramente as bandas do gel foram transferidas para um tubo de 1,5 mL e ao tubo foi adicionado 100 µL de bicarbonato trietilamônio (TEAB, pH 8) 0,02M/acetonitrila (ACN) 100% (1:1 v/v). O tubo foi incubado por 20 min, com agitação ocasional, em agitador do tipo vortex, ao longo desse período, posteriormente foram adicionados 500 µL de ACN 100% e após a banca do gel adquirir uma coloração esbranquiçada, os tubos foram centrifugados em microcentrífuga do tipo spin. O

sobrenadante foi descartado e 50 µL de DTT (0,1 M em TEAB 0,02M) foram transferidos para o tubo. O tubo foi incubado por 30 minutos a 56°C, sendo imediatamente resfriados, após a incubação, e adicionados 500 µL de acetonitrila (ACN) 100%. Novamente, os tubos foram incubados por 10 minutos e posteriormente centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o pellet de gel foi submetido a centrifugação no speedvac para a evaporação do líquido contido no gel. Após a secagem foram adicionados 50 µL de TEAB 0,02 M com tripsina na concentração de 15ng/µg e o gel foi macerado e incubado por 18 horas à 37°C. Após a incubação os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo do tipo *Low-binding*. O restante do gel foi submetido a extração de peptídeos com 200 µL ACN 50%, em seguida as amostras foram incubadas por 5 minutos em sonicador e por mais 25 minutos em agitador. Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi reunido com o sobrenadante coletado após a incubação com tripsina, por fim os sobrenadantes foram submetidos a secagem, sendo ressuspensos com ácido trifluoracético (TFA) 20%. O material foi submetido a dessalinização e identificação de peptídeos por LC-MS/MS.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) – ABORDAGEM BUTTON-UP

Uma amostra de peptídeos trípticos equivalente a 1 µg foi injetada em coluna empacotada com resina Reprosil-Pur 120 C18-AQ (tamanho de partícula de 5 µm, 5 cm de comprimento, diâmetros interno e externo de 100 µm e 360 µm, respectivamente). A coluna foi empacotada utilizando um Nano LC Ultimate 3000 (Dionex, Amsterdã, Holanda). Após lavagem com solvente A (acetonitrila (ACN) 5% (v/v), ácido fórmico (AF) 0,1% (v/v)), os peptídeos foram eluídos durante o gradiente em uma coluna empacotada com a mesma resina (tamanho de partícula 3 µm, 15 cm de comprimento, diâmetros interno e externo de 75 µm e 360 µm, respectivamente), em um fluxo de 250 nL/min. O gradiente consistiu de uma etapa de 5-20% do solvente B (ACN 95% (v/v), AF 0,1% (v/v)) durante 30 minutos; 20-50% do solvente B durante 15 minutos; 50-98% do solvente B durante 5 minutos; e 98% do solvente B durante 10 minutos. Os peptídeos foram dinamicamente eluídos em um espectrômetro de massas do tipo LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), através de uma sonda do tipo *nanospray* (Thermo Scientific, Alemanha), com uma voltagem de *spray* de 3,02 kV, e temperatura de transferência capilar programada para 275°C. O espectrômetro foi operado

no modo de Aquisição Dependente de Dados usando o programa Xcalibur versão 2.2 (Thermo Scientific). O ciclo de aquisição consistiu de um escaneamento na faixa de 350-1500 m/z a uma resolução de 120000 (largura completa na metade do máximo) em m/z de 400. Foi utilizado um *microscan* de 5×10^5 cargas no Orbitrap. Uma fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) sob energia normalizada de colisão de 35% foi utilizada na fragmentação dos 15 precursores de carga múltipla mais intensos. O limite de seleção de íons para MS/MS foi programado para 1500 contagens usando uma janela de isolamento de precursor de 2 amu. A ativação do 135 parâmetro "q" e o tempo de ativação foram programados para 0,25 e 0,10 ms, respectivamente. Os precursores previamente fragmentados foram dinamicamente excluídos durante o ciclo por mais 30 segundos. As análises de bioinformática foram realizadas pelo Prof. Dr Agenor Junior e pelo aluno Ms. Reynaldo Melo do departamento de Bioquímica da Universidade de Brasília. Os arquivos foram analisados contra o genoma de *C. rosea* (Karlsson et al., 2015), utilizando o programa Peaks, versão 7 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Ontário, Canadá). As proteínas foram identificadas considerando a detecção de, pelo menos, dois peptídeos únicos, e uma taxa de descoberta de falsos-positivos (FDR) de 1%. Foram empregados filtros de tolerância de 0,5 Da para espectros parentais e 10 ppm para espectros sequenciais (*tandem*). Foram geradas listas de identificação independentes para cada condição.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) – ABORDAGEM TOP-DOWN

O preparo das amostras foi feito por precipitação com metanol/clorofórmio/água (Wessel and Flügge 1984). Brevemente, metanol/clorofórmio/água (4:1:3) foram adicionados à amostra com vortex entre as adições. A solução foi então submetida a centrifugação sob 21.000 x g. A fase polar foi descartada com cuidado deixando a fase apolar e as proteínas precipitadas logo acima dessa. Então foram adicionados 3 volumes de metanol e a solução foi novamente centrifugada a 21.000 x g por 10 min para lavagem, processo esse que foi repetido 3 vezes. Após a precipitação, as amostras foram ressuspendidas em tampão de injeção (ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 5%) e armazenadas em -80°C para injeção em LC-MS/MS. As análises de LC-MS/MS foram realizadas em Nano-UHPLC (*Ultra high performance liquid chromatography*) Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific™) acoplado a um espectrômetro de massas

LTQ-Orbitrap Elite (espectrômetro de massa *iontrap*-orbitrap híbrido, ThermoFisher Scientific™).

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi feita com resina PLRP-S 1000 A, 5 μ M (Agilent) empacotada em colunas de 30 cm para coluna analítica e 4 cm para coluna de carregamento (*trap*). A fase móvel utilizada foi acetonitrila (B) e água (A) em corridas de 90 min com fluxo constante de 0,3 μ L/min. O gradiente utilizado foi o seguinte: 5% B por 10 min, 20% B por 45 min, 55% B por 5 min, 85% B por 20 min e por último 5% B por 10 min. A aquisição foi feita ao longo de 90 min de eluição da coluna analítica utilizando ESI (*electrospray ionisation*) em modo positivo. Foi utilizado SID (*source-induced dissociation*) = 15 V e 35 V, primeiro e segundo íon mais intensos respectivamente. A aquisição de MS2 ou MS/MS foi feita de modo dependente de dados (*data dependent acquisition*, DDA), fragmentando os dois íons mais intensos por HCD (*high collision dissociation*), sendo excluídos dessa seleção íons com sinal < 500, dentro de janela de isolamento de 25 m/z ou com carga < 4. MS1 e MS2 foram realizados com resoluções de 240.000 FWHM e 120.000 FWHM, respectivamente. Os dados *.raws adquiridos foram convertidos para *.mzML usando o ProteoWizard toolkit (Chambers et al. 2012) e os dados resultantes foram submetidos ao TopPIC suíte para deconvolução de espectros, identificação e caracterização de proteoformas (Kou et al. 2016). A identificação foi feita usando banco de dados de *Clonostachys rosea*. Foram permitidas duas variações de massas entre -500 Da e 500 Da, formas com N-terminal clivado ou não e com ou sem acetilações no N-terminal. Todas identificações foram filtradas baseado em FDR (*False Discovery Rate*) de 0,01 no nível de PrSMs (*Proteoform spectrum matches*).

ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

As mensurações de espalhamento de luz dinâmico ou DLS do inglês *Dynamic Light Scattering* foram feitas em um *Zetasizer Nano Series Nano-ZS* (Malvern Instruments, Reino Unido) para determinação do tamanho de partícula/moléculas a 20 °C. Um laser He-Ne com $\lambda = 633$ nm foi utilizado para medições, em ângulo de 173°, com detecção de retrodispersão, usando a cubeta de plástico. Os experimentos foram realizados com as frações de proteínas eluídas nas cromatografias e nos correspondentes tampões. As amostras semi-purificadas foram centrifugadas a 10 000 x g durante 15 min a 4 °C antes das medições. O DLS foi utilizado para avaliar as populações de proteínas

em solução, verificando a polidispersividade, a massa molecular e diâmetros hidrodinâmicos.

EXTRAÇÃO DE RNA

Para obtenção do micélio, o isolado *C. byssicola* foi crescido em cultivo estacionário nas mesmas condições descrita para o cultivo do fungo (capítulo 2). Após o cultivo, o micélio foi removido com o auxílio de uma pinça estéreo e imediatamente macerado em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando o reagente trizol (Invitrogen) conforme o método recomendado pelo fabricante, em que para cada 100 mg de micélio foram adicionados 1 mL do reagente trizol. Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente para permitir a dissociação completa do complexo de nucleoproteínas. Após incubação, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas por inversão do tubo e incubadas por 5 min a temperatura ambiente. Para a separação dos componentes celulares, realizou-se a centrifugação dos tubos por 15 min a 12.000 x g em baixas temperaturas (4 °C). Três fases puderam ser observadas após a centrifugação: a fase orgânica, em que são encontradas proteínas e lipídios; a interfase, no qual estão contidos o DNA e a fase aquosa, região em que se encontra o RNA. A Fase aquosa foi capturada e transferida para um tubo novo para o isolamento do RNA. Uma quantidade de 500 µL de isopropanol foi adicionado nas amostras, sendo essas incubadas por 10 min a temperatura ambiente e posteriormente submetidas a centrifugação (12.000 x g) por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets contendo os RNAs precipitados foram ressuspensos com 1 mL de etanol 75 %. As amostras foram submetidas a agitação em vortex e centrifugadas (7500 x g) por 5 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram incubados para secagem em temperatura ambiente. Uma vez seca, as amostras foram ressuspensas em 50 µL de água mili-Q RNase free e congeladas a -80 °C.

GEL DE AGAROSE

A qualidade e integridade das amostras de RNA e cDNA foram avaliadas a partir do gel polimerizado de 1% de agarose, dissolvido em tampão 1x de Tris/borato/EDTA e com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As bandas foram visualizadas em transiluminador

com luz ultravioleta.

REAÇÃO TRANSCRIPTASE REVERSA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit de transcrição reversa *GoScript* (Promega/ REF A500). O procedimento foi realizado segundo as instruções sugeridas pelo fabricante utilizando primers Oligo (DT)₁₅. Os detalhes da reação estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Reação transcriptase reversa

	Concentração inicial	Concentração final	Volume
<i>RNA</i>	35 ng/μL	3 μg	9,6 μL
<i>Primer Oligo(DT)₁₅</i>	50 μg	0,5 μg	1 μL
<i>Tampão GoScript</i>	5x	1x	4 μL
<i>MgCl₂</i>	25 mM	2,5 mM	1,5 μL
<i>PCR nucleotídeos</i>		0,5 mM	1 μL
<i>RNasim</i>			1 μL
<i>H₂O RNase free</i>			1,4 μL
<i>GoScript</i>	40 U	20U	0,5 μL
<i>Volume final</i>			20 μL

DESENHO DOS PRIMERS

Foram desenhados oligonucleotídeos para amplificação dos cDNAs correspondentes às sequências de mananase identificadas por espectrometria de massas. O programa *SnapGene* foi utilizado para o desenho dos *primers* e posteriormente seus parâmetros (Temperatura de anelamento, formação de *hairpin*, formação de *self-dimer*, formação de *hetero-dimer*) foram avaliados utilizando a plataforma *Oligo Analyzer* (<https://www.idtdna.com>). Nos oligonucleotídeos foram adicionados sítios de ancoragem reconhecidos pelas enzimas de restrição PstI e XbaI, respectivamente.

REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR)

Inicialmente a reação de PCR foi realizada em duas condições de temperatura, com intuito de avaliar a melhor condição de amplificação para os *primers* (tabela 9). A

enzima utilizada foi adquirida junto a Promega (*Go Taq HotStart Polymerase*). As reações foram colocadas em um termociclador com a seguinte reação:

- 95°C por 1 minuto
- 95°C por 30 segundos
- 59,4°C/56,5°C por 30 segundos
- 72°C por 3 minutos
- 72°C por 5 minutos
- 4°C por tempo indeterminado

A reação foi programada para 30 ciclos, posteriormente a qualidade e integridade dos produtos de reação foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose.

Tabela 9. Reação em cadeia polimerase

	Concetração inicial	Concentração final	Volume
<i>cDNA</i>			2 µL
<i>Primer F</i>	10 mM	0,5 mM	1 µL
<i>Primer R</i>	10 mM	0,5 mM	1 µL
<i>MgCl₂</i>	25 mM	2,0 mM	1,6 µL
<i>Nucleotídeos</i>	10 mM	0,2 mM	0,4 µL
<i>Tampão grennGotaq</i>	5X	1X	4 µL
<i>H₂O RNase free</i>			9,75 µL
<i>Go taq Hot Start</i>	5 U	1,25 U	0,25 µL
<i>Volume final</i>			20 µL

PURIFICAÇÃO DOS CDNAS PROVENIENTES DA PCR

Uma vez confirmada a amplificação do cDNA, 10 µL da reação foram aplicados em gel de agarose. Após a corrida, a banda do gel, referente ao produto de PCR, foi removida e submetida à purificação utilizando o Kit *GeneJet Gel extraction* (Thermo Scientific).

DIGESTÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO E DO CDNA PURIFICADO

Os produtos de PCR e o vetor de expressão pGAPZ α B (Figura 30) foram digeridos com as enzimas de restrição PstI e XbaI (*fast digest*, Thermo Scientific). Cada reação foi realizada com 0,5 μ L de cada enzima, tampão universal (Thermo Scientific) na concentração final de 1x e 2 μ g dos respectivos materiais a serem digeridos (vetor e cDNA), totalizando um volume final de 20 μ L. As reações foram incubadas por 20 min à 37°C, posteriormente a qualidade da digestão foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose.

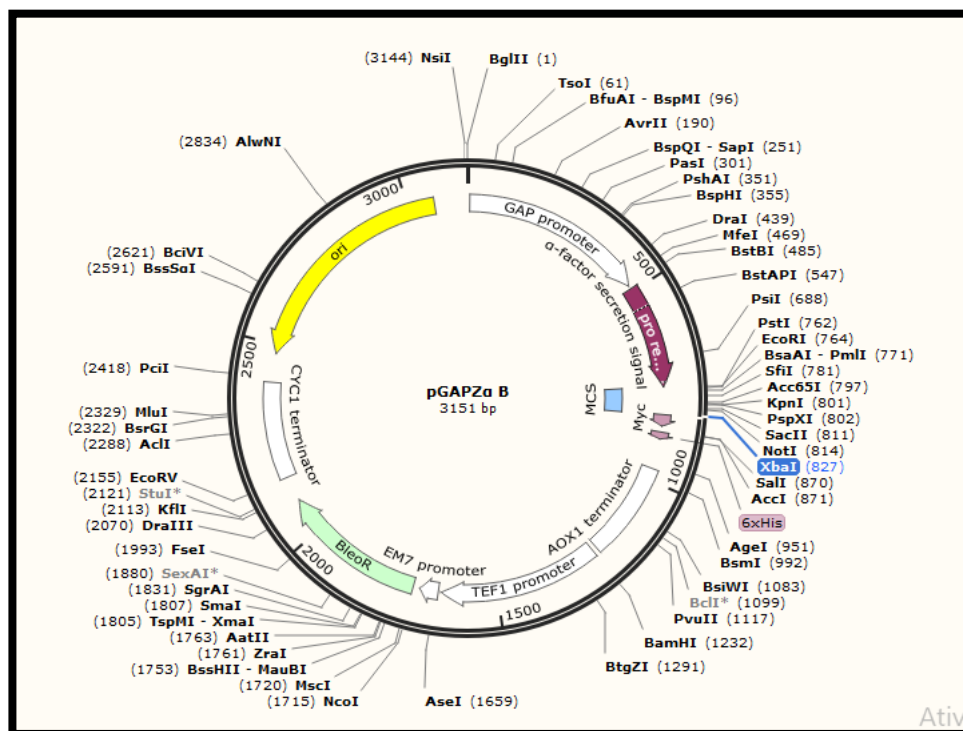


Figura 30. Esquema do plasmídeo pGAPZ α B.

PURIFICAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DO RNA

O DNA contaminante foi removido da amostra do RNA por meio do tratamento com uma DNase (Promega), em que para cada 1 μ g de RNA foi considerado uma unidade da enzima DNAs. O protocolo foi realizado seguindo o manual da Promega no qual um volume final de 10 μ L foi considerado. Após a incubação da amostra em 37 °C, durante o período de 15 min, o RNA foi precipitado utilizando 5,5 μ L de acetato de sódio (3M) e 150 μ L de etanol. Posteriormente a amostra foi incubada a -20 °C *overnight*. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 12000 x g por 5 min a 2 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido a secagem em temperatura ambiente. Por fim, a

amostra foi ressuspensa em água mili-Q RNase *free*.

ELETROELUIÇÃO

As amostras excisadas do zimograma foram cortadas em pedaços pequenos com o auxílio de uma pinça e posteriormente submetidas a uma câmara de eletroeluição com 250 μ L de tampão de corrida 1x (tris, glicina e SDS). Foi aplicado uma amperagem constante de 10 mA durante o período de 15 min. As amostras eletroeluidas foram congeladas a -20 °C e, posteriormente, analisadas em espectrômetro de massas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS MANANASES DE *CLONOSTACHYS BYSSICOLA*

ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO #1:

Na estratégia #1 de purificação (Figura 29-A), a purificação parcial foi realizada à temperatura ambiente, em que a amostra do extrato bruto concentrado por ultrafiltração com membrana de retenção de 30 kDa, foi aplicada em coluna de troca aniônica do tipo Q *Sepharose Fast Flow*. Na figura 31 verifica-se que na eluição foram separados três picos de atividade de mananase. O primeiro pico foi eluído nas primeiras frações não ligadas a coluna do cromatograma denominado fração mananase QFF-PICO 1. Os outros dois picos eluíram durante o gradiente de NaCl e foram denominados fração mananase QFF-PICO 2 e fração mananase QFF-PICO 3. Junto com a atividade de mananase foram detectadas atividades de CMCCase, xilanase e pectinase nas frações correspondendo aos picos QFF-PICO 1 e QFF-PICO 3, contudo na fração QFF-PICO 2 duas atividades residuais de xilanases e pectinases coeluíram juntamente com a atividade de mananase. Dessa forma devido ao grau de pureza da fração QFF-PICO 2, esta foi utilizada para análise em espectrometria de massas (abordagem *bottom-up*), mas em razão da baixa atividade e concentração desta amostra, não foi possível dar sequência a futuras etapas de purificação. Diante disso, a fração QFF-PICO 3 foi utilizada para as demais etapas de purificação, com o intuito de obter uma fração com menores teores de contaminação proteicas.

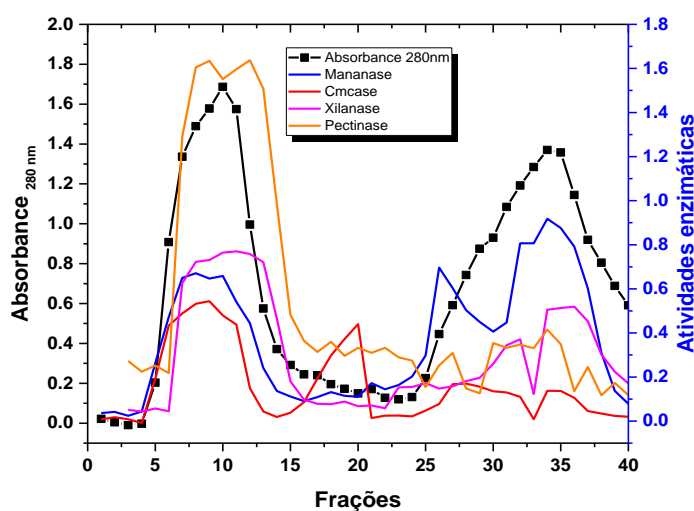


Figura 31. Perfil cromatográfico do EBC em cromatografia de troca aniônica Q sepharose fast flow. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 0,33 mL/min, coletando frações de 5 mL. Em pH 7,5 utilizando tampão fostato de sódio.

A pureza das frações e o número aproximado de enzimas analisada por SDS-PAGE e zimografia pode ser visualizado na figura 32. A multiplicidade de proteínas que eluíram no cromatograma é exibida no gel SDS-PAGE. Como observado, a quantidade de proteínas ao longo das etapas de purificação diminuíram de forma expressiva na fração QFF-PICO 2. Com base na degradação do substrato copolimerizado com galactomana 1%, o zimograma apresentou várias proteínas com atividade mananase. A identificação de proteoformas de mananases é uma característica pouco descrita na literatura, podendo ser encontrada multiplicidades de mananases descritas apenas no trabalho de Hilge et al. (1996), onde foram identificadas três mananases produzidas por *Thermomonospora fusca*, embora as enzimas apresentassem pontos isoelétricos equivalentes, a mesma temperatura, pH e modo de ação, os tamanhos moleculares das enzimas eram diferentes, alternando entre 38 e 47 kDa. De acordo com Hilge *et al.* (1996), possivelmente essas diferenças de tamanho poderiam ser explicadas pelo grau de glicosilação, como também por outro tipo de processamento, como por exemplo a clivagem proteolítica dessas enzimas, uma vez que análises genômicas indicaram que as enzimas eram derivadas do mesmo gene. De acordo com Lermyte e Sobott (2015), proteoformas podem ser resultantes do *splicing* alternativo do RNA, pela ocorrência de mutações específicas, e por modificações pós-traducionais.

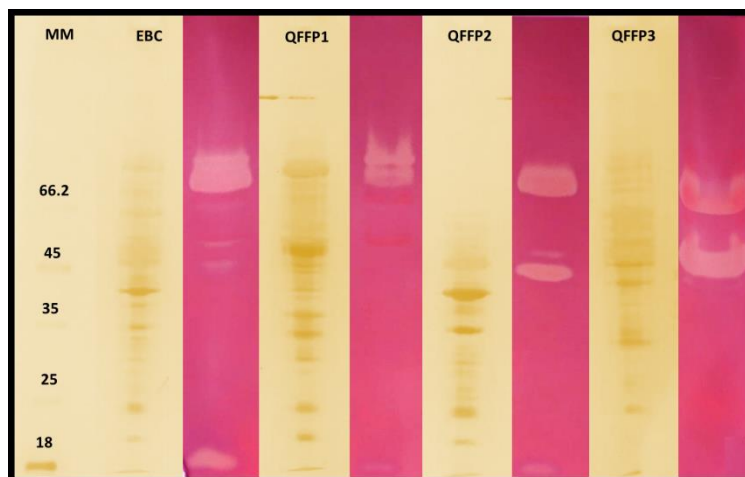


Figura 32. SDS-PAGE e zimograma (em rosa) do EBC e das frações cromatográficas de QFF fast flow. Abreviações: MM, marcador molecular; EBC, extrato bruto concentrado; QFFP1, fração mananase QFF pico 1; QFFP2, fração mananase QFF pico 2; QFFP3, fração mananase QFF pico 3.

Seguindo a etapa de purificação, a fração QFF-PICO 3 foi aplicada em coluna de troca aniônica do tipo *Q Sepharose high Performance* (QSHP) (Figura 33), nesse caso observou-se a presença de dois picos com atividade de mananase que eluíram antes e durante o gradiente de NaCl, respectivamente. As atividades de mananases que eluíram durante o gradiente, *Q sepharose high performance* fração 11 (QHP11) e *Q sepharose high performance* fração 12 (QHP12), mostraram atividades residuais de xilanases e pectinases e um baixo perfil de proteínas.

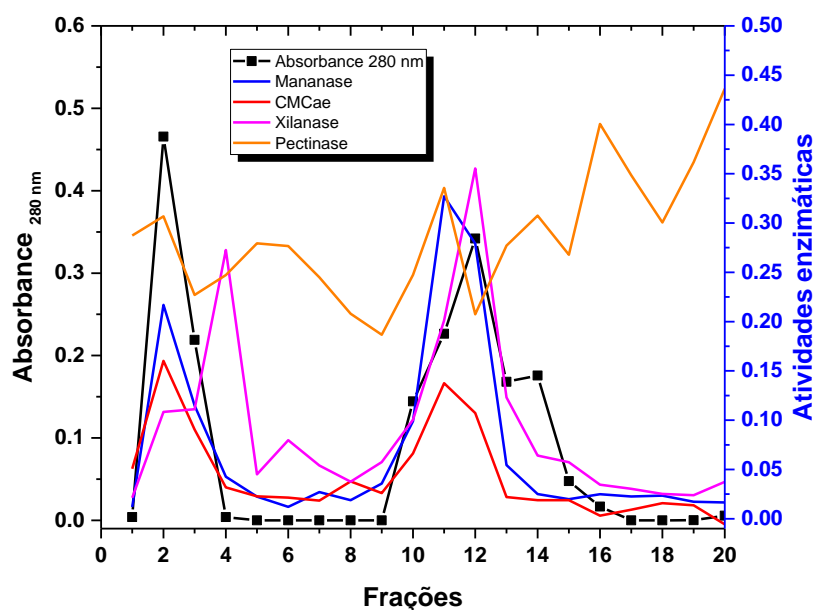


Figura 33. Perfil cromatográfico da fração QFF-PICO3 em cromatografia de troca aniônica Q sepharose high performance. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 1 ml/min, coletando frações de 1mL.

O perfil de proteínas da fração cromatográfica pode ser observado nos resultados de SDS-PAGE na Figura 34. Nota-se que parte das proteínas foram eluídas no primeiro pico da cromatografia (QHPPICO1) com tamanhos variados, em contrapartida, poucas proteínas foram observadas nas frações com atividade de mananase eluídas no gradiente (QHP11-12) (Figura 34). Devido ao maior grau de pureza das amostras provenientes da cromatografia de troca aniônica *Q Sepharose high performase*, a fração QHP12 foi utilizada para identificação em espectrometria de massas utilizando a abordagem top-down.

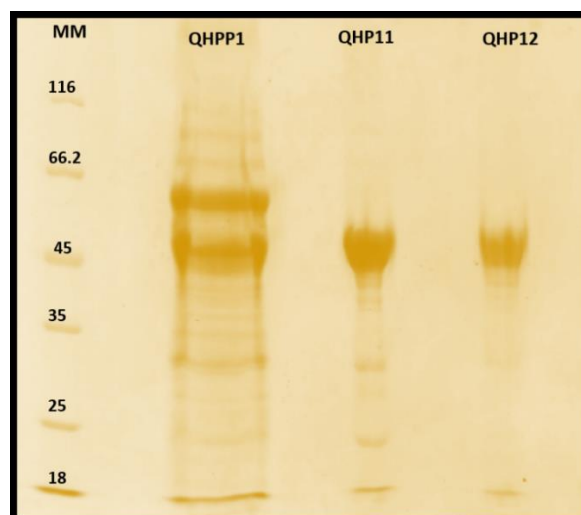


Figura 34. SDS-PAGE da fração cromatográfica QFFG2 em cromatografia de troca aniônica Q sepharose high performance. Abreviações: MM, marcador molecular; QHPP1, fração pico 1; QHP11, fração 11; QHP12, fração 12.

IDENTIFICAÇÃO DE MANANASES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para a identificação das mananases (provenientes das frações cromatográficas da primeira estratégia de purificação) por espectrometria de massas foram utilizadas duas abordagens diferentes. A fração do pico 2 da cromatografia de troca aniônica QFF foi aplicada em LC-MS/MS utilizando a proteômica *bottom-up* e a fração resultante da cromatografia de troca aniônica (QHP12) por apresentar maior grau de pureza foi submetida à análise em LC-MS/MS com abordagem *top-down*. Nas análises de bioinformática de busca no genoma de *C. rosea* sequenciado por Karlsson et al. (2015), foi possível encontrar uma endo-(1,4)- β -manosidase predita (BN869_T00006860). A endo- β -mananase (BN869_T00006860) identificada foi classificada dentro da família GH5, pelo banco de dados dbCAN (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/index.php>). Dentro do família GH5 podem ser reconhecidos diversos grupos de enzimas, entre as enzimas avaliadas são descritas compondo esta família endo- β -mananases (EC 3.2.1.78) e as exo- β -mananases (EC 3.2.1.25).

Em relação aos peptídeos analisados por *top-down* da fração QHP12 foi identificado uma proteína com uma massa molecular de 46 kDa e algumas prováveis modificações pós-traducionais (PTMs) com tamanhos que variam entre 266,16-268,2 Da. Por meio da busca no banco de dados de proteínas identificou uma provável celobiohidrolase (BN869_T00012520_1) e a identificação de domínios conservados de

enzimas ativas por carboidratos na plataforma dbCAN (), que possibilitou a classificação na família de GH7 não pertencente à família das mananases.

A busca por PTMs no banco de dados *Protein Information Resource* identificou proteoformas com adição de ácidos graxos (identificado como um agrupamento esteroil em resíduos de cisteína), fosfato e glicoproteínas. As PTMs são essenciais para a regulação de numerosos processos em eucariotos. A identificação dessas modificações por meio de espectrometria de massas tem evidenciado uma vasta gama de PTMs que ainda são alvos de estudos (Cain, Solis, e Cordwell 2014).

As análises físico-químicas *in-silico* com a ferramenta ProtParam ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) possibilitou calcular a massa molecular e o ponto isoelétrico teórico para a proteína endo- β -mananase (BN869_T00006860) de 106 kDa e 5,69, respectivamente. Além disso, a plataforma é capaz de avaliar a estabilidade e a termoestabilidade teórica da proteína. Esta avaliação é realizada pela composição dos resíduos de aminoácidos. O índice de estabilidade predito para essa proteína foi de 31,91 o que a classifica como estável. Este índice é baseado em uma escala de estabilidade em que valores inferiores a 40 a proteína pode ser considerada estável, enquanto valores superiores a 40 preveem uma proteína instável (Guruprasad et al. 1990). Com relação à termoestabilidade, a plataforma evidencia um parâmetro denominado índice alifático, no qual avalia o volume relativo de uma proteína ocupado pelas cadeias laterais alifáticas (alanina, valina, isoleucina e leucina), quando maior índice, maior a termoestabilidade de proteínas. A sequência de proteína predita para a mananase apresentou índice alifático de 80,33, indicando ampla termoestabilidade.

A análise por signalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para organismos eucariotos detectou a presença de um peptídeo sinal secretório do tipo padrão Sec/SPI (Figura 35) entre os resíduos 1 a 22 da endo-(1,4)- β -manosidase predita (BN869_T00006860). Devido à identificação de mananases secretadas quando *C. byssicola* utilizou a casca de soja como fonte de carbono, a presença de peptídeo sinal na sequência de proteína de mananase já era uma característica esperada.

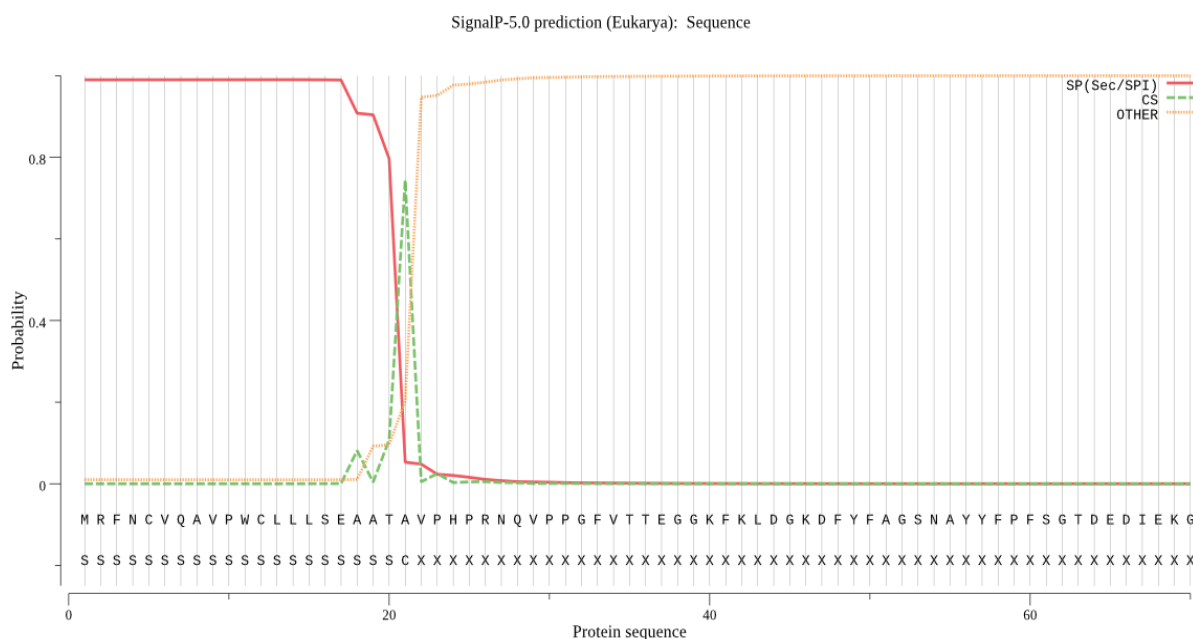


Figura 35. Predição do peptídeo sinal para endo- β -mananase (BN869_T00006860) realizada por meio da plataforma SignalP 5.0. A linha contínua na cor vermelha (SP/SPI) indica a presença e o tipo de peptídeo sinal identificado; a linha tracejada (CS) na cor verde a sugestão para o sítio de clivagem entre o aminoácido ATA-AV; a linha salmão (OTHER) indica a probabilidade de que a sequência não tenha peptídeo sinal.

A sequência correspondente ao transcrito obtido a partir do genoma de *C. rosea* é apresentada a seguir (Figura 36), servindo como parâmetro para o desenho dos *primers* na estratégia de identificação por biologia molecular. Como observado anteriormente, o peptídeo sinal foi destacado nos oligonucleotídeos iniciais da sequência (oligonucleotídeos em amarelo). No desenho dos *primers* as sequências destacadas em vermelho correspondem aos sítios de ancoragem das enzimas de restrição, e os oligonucleotídeos em negrito correspondem aos sítios de corte para as enzimas. Os *primers* utilizados na reação de PCR delimitaram uma sequência de 2800 pares de base.

Após a identificação do transcrito predito e o desenho de *primers*, foi realizado a extração de RNA, como descrito na metodologia, resultando em produtos íntegros, no qual pode ser observado na Figura 37 produtos correspondentes as frações de RNA ribossômico 28s e 18s, indicando que os RNAs não estão degradados. Sabido das condições de integridade do RNA, o mesmo foi utilizado a síntese de cDNA como descrito na metodologia.

5' AAAA**CTGCAGATGCGCTCAATTGTGTCATGCGCTCAATTGTGTCCAAAGCGGTACTTGGTGCTACTTCTGTGTCAGAGGCAGCAACCGCGGT**CCCTCATCCCCGAAATCAG
 GTTCCCTCAGGT TTTGT TACGACTGAAGTGGGAAGTCAAGTGGATGGGAAAGACTTTTACTT TCCCGATCCAATGCGTAT TAT TCCCTTCTCTGG TACGGACGAAAT
 ATCGAAAAGGGCTGAAGCGCAGCCGTTGAGGCAAACTCAAGGTGTTCCGACTGGGGATTCAAGGACAAGAAATGTCACCTACAATCCGACGGTCTTCCCAATATGTG
 ACGAGGGTGTGGAGCGACCGAGGTTGTTTCAACGATGGGCAATGGAATCAAATTCAGCGTCACTCCCTT TGAACGAGTGTGCGGCGCAGAGAAACGACAT
 CAAGCTCTTAGTTGCGCTGACGAACAATTGGCCGACTATGAGGCTCTGATGCTATGTCTGTGAATCTTGGCGCCAGTATCATGACGATTTTACAAGTTCTCGAATCAAG
 GAGCTTTTAAAGCCTTATGTCAAAGAGTTTGTGACTCGATACAAGATTCGCCACAATCTTCCCTGGGAGCTTGGAAATGAGCCTAGATGTGGCCGAGATGGCGTGGCAA
 TCTCCCGAGGAGCGAAGACGGCTCGATCCTCATGTCTCGGCGCTTGGATCTTGAAGATGAGCGCATACATCAAGGAAATCGATCCCAACATCTCGTAACCTTGGGGTGGCGA
 AGGTGATTTCAATATCGAATCCGATGACTGGGCATATAATGGTGAAGAATGAGGAGACTTCTCAGCTGACATCGCTTGGACACCATGACTTCGGCAGTTCACCTCTATCCG
 GACTGTGGAGCAAGACAGTCTGAGTGGACAGATCAGTGGATCAAGGATCATGCTGAAGTCTCGGAAGGCCAACAGCCGTTCTTCATGAAGATACGGGTGGATGACA
 GACTTGGGAAGATGGAAATCTTGGCAAGGTGAGCAAGTGTGAGAAATCGAGGCCATCGGGGATGGCAGCAATCGTCTCGAGGAAAAGATTTCCGATATGACTGG
 CAGTACGGATACTCGGGCTATTCGTATGGAAGAAACCAATGACTCTTACCACTATT TGGACGATGAGGAGGCCAAAACCTGGTCTACAAAACACGCCAAGGATATGGAG
 AAACGAAACATACTGGGGCGATCAATGACTTGTGCAATGAAGTATCAGCGCAAAAATGGCCGCTCTTACAGCACCCGGGAGGAAATCGACGACGCCATTTCGGCACT
 GACAGCCACCTTTGCCACTGGAAGAACCAAGGATCTTGGTGGAGGAAATGGCAGCTGAAGCAGCTCTGGTGGCTCCTTGAAGACAACGAAGAACGAATCTTGAAGTGT
 GCGCAAGACCTAGATCGCCACATTCGAAGCTGATGACAGATCTCTGGTTTGAAGAGGAGATTCTCGACTTCTCAAGAACTTGGACAAATGGACGGCTGAAGTCA
 AGATAGCGCTGGCTTCAATTTCCGATATCTCAGCAAATCGCATATCGCAAGGAGCCTTTGGGAGTGTCTCTCATATTGGCGCATGGAATTCCTCAATCTCATGGCCACTG
 CCAAGTAGCTGCTGCAATTCGCTGGCTTGGTGGTGTGATCAAGCCTTGGAGCTCGTATCACTCGAGGCCCTTCAAGGAGCTTATCCAAAGTATCTGGAACCAACG
 GCTATTCGTATTTGACTGGTGGTGTATCCGAGACTACATATATCTCGAAGCGATGGAATCAGATCTTTTCACTGGATCCAGTAAAGTCGGCCAGTTTTCGCTGAGGCTG
 CGCAAGCACCTGACACCTACGGTCTCGAACTTGGAGGACTGGGTCGGCAGTTGTCAAAAACTGCTGATATGATCGGCTGCCCGCGCAATCGCCTTTTCAAGTTTGT
 CAACCGTGGTCAGATATGTTGCTGTCAATCACGTATCGCCGAGCCTGAAATCTGGACAAGTTGGTGGAGAGATTGCTGACTGGAATGATCAATTCGTGAAGGAGGGAG
 ACAACACCATGTGCAAGATATCAACGCTCGCAACTTTGACAGACTCGCTGACCTCTCGAAGAAACAAATGGCAAGATTGTCTATGGTGGAAAGTTGGACAAGAGGGCGACA
 TTCAATTCACCAACCTCGTCAGGAATGTCACCTCTCGAGGACTCGCTCATGTCGGAGGAGATGTTTGGGCCGATCTTCCATCATCACGGCCACCTTCGAGGACGCCATTCACT
 GCATCAACTCGCTCTCCAACTCTCGCCTCGTACATCTTAGCAAGAGCAGCTCTATGTTGTCAGGACTTCTTGAACCGAACGCTGAGCGGAGGAGTGAACGGTCAACACGCTG
 TGATGATTCTGTCTGTCGGCGGGCACCGTTTCGGAGGGGTCGGCGGATCTGGATATGTTACTACACGGCGTGAAGGAATCGACTGTTTACTCAAAAGCGGACTGTTTACC
 ACACCACCTTCAATGGCTAGATGGCTGATGCTTTCCTTACCTCTTATCACTCAGCAAGGTGAGCTACGTCAGGCAAGAACTCTCTGGGATTCAAGAGAGGGGAGAC
 CTTGGAAGACCAACCGAAGGTTCTCGGGGCAAGGAGCTGGCATTGTCGGCAGCCGCGCCTTGGAGAGGATCAAAATTCGGATACCAAGTCCGTCAGAATGAAGGA
 GATTGCTGTACGCTCCGTTTGGATGATCTGAGACGGCGGAGTATCGAGGTGAG**GCTCACTAAGCTCACTAGATCTCGT3**

Figura 36. Transcrito predito para endo- β -mananase (BN869_T00006860) identificada a partir da fração semi-purificada por cromatografia (QFF-PICO2). A sequência em vermelho, preto e azul corresponde a sequência do primer desenhada, em que a enzima de restrição PstI (fast digest, termo Scientific) reconhece a região em negrito (identificada pela seta) no sentido 5' e a enzima XbaI reconhece a região em negrito (no sentido 3'); a sequência destacada em laranja corresponde ao peptídeo sinal.

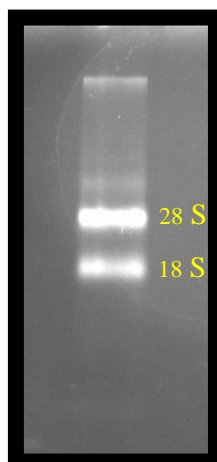


Figura 37. Análise da qualidade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%. As duas bandas presentes em destaque referem-se as bandas de RNAs ribossomais (RNAr) 28S e 18S.

O resultado da reação de síntese de cDNA foi avaliado por PCR (Figura 38). Nas duas condições experimentais da PCR foi amplificado uma única banda com o tamanho estimado de aproximadamente 3000 pb, não mostrando diferença entre ambas as condições de temperaturas analisadas. Ao que tudo indica, os *primers* foram capazes de amplificar especificamente o transcrito de mananase de *C. byssicola* predito.

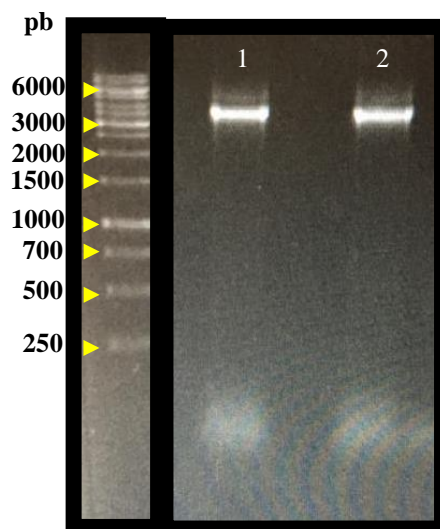


Figura 38. Figura 38. Gel de agarose 1% mostrando os produtos de amplificação dos cDNAs responsáveis por codificarem mananases obtidas por *C. byssicola*. As setas indicam os diferentes tamanhos do marcador molecular representados em pares de base (pb). A amostra 1 indica o produto de PCR obtido quando utilizada uma temperatura de 59,4 °C na fase de alongamento da PCR. A amostra 2 indica o produto de PCR obtido quando utilizada uma temperatura de 56,5 °C na fase de alongamento da PCR.

Após a confirmação da amplificação do transcrito predito, os produtos de PCR foram purificados do gel. Contudo, quando as amostras foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição XbaI e PstI, pode-se notar que houve clivagem dentro do gene que codifica a produção de mananase uma vez que várias bandas com tamanhos entre 1500-3000 bp foram observadas (Figura 39, amostra 1). Esse resultado instigou a profundas análises no banco de dados gerado por *Karlsson et al. (2015)*, constatando que algumas sequências depositadas não foram totalmente sequenciadas, tornando questionável se a sequência de mananase encontrada por meio desse banco de dados estaria de fato correta. A análise feita para a escolha das enzimas de restrição constatou que dentro da sequência nucleotídica predita de mananase não havia sítio de clivagem para as enzimas selecionadas. Mas, não se pode descartar outras causas como a presença de isoformas enzimáticas com tamanhos semelhantes que possam apresentar esses sítios de restrição e a aparição dos sítios internos de restrição no cDNA amplificado como resultado dos processos de splicing do RNA mensageiro entre outros. No entanto, a clivagem dentro da sequência de cDNA indica bandas com tamanhos aproximados de 1500 pb a 4500 pb, revelando que provavelmente no meio da sequência de cDNA existam códons não processados.

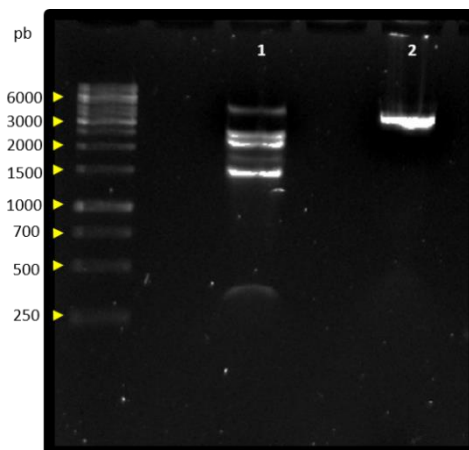


Figura 39. Gel de agarose 1% mostrando a purificação e digestão do produto do cDNA amplificado. As setas indicam os diferentes tamanhos do marcador molecular representados em pares de base (pb) de mananase. A amostra 1 indica a digestão do transcrito predito; a amostra 2 indica a digestão do vetor de expressão pGAPZ α B.

A repetição de todo o experimento envolvendo a parte de biologia molecular (extração de RNA, produção de cDNA e teste dos *primers*), foi realizada a fim de confirmar os resultados obtidos na Figura 39. De forma não esperada, o tratamento do RNA com DNases, seguida da produção de cDNA por PCR, revelou que os *primers* desenhados para a sequência predita de mananase não foram capazes de reconhecer e amplificar a amostra de cDNA. Apenas foi reconhecido e amplificado o cDNA decorrente do RNA não tratado. A explicação provável para tal resultado poderia estar relacionada com o fato de os *primers* estarem reconhecendo o DNA genômico contaminante e não a sequência de cDNA (dados não mostrados).

O reconhecimento de *gaps* encontrados no sequenciamento realizado por Karlsson e colaboradores (2015) também pode ser evidenciada por Broberg et al. (2018). Desta forma, foram delineadas as seguintes questões: a) se a sequência obtida por meio dos transcritos preditos utilizando o banco de dados de *C. rosea* estivesse errada, seria possível identificar a sequência por meio do sequenciamento? b) a obtenção de mananases por meio de outra metodologia facilitaria a identificação utilizando um banco de dados diferente ao utilizado? c) seria possível sequenciar todas as mananases produzidas por *C. byssicola*?

A partir dessas questões foram delineadas novas metodologias a fim de identificar as mananases secretadas por *C. byssicola*.

SEQUENCIAMENTO DO TRANSCRITO PREDITO

O sequenciamento do cDNA que codifica a mananase predita por *C. byssicola* realizado pela empresa macrogen (metodologia sanger) evidenciou por meio do alinhamento múltiplo que ambas as sequências contêm regiões que não se sobrepõem (Figura 40). A análise do sequenciamento demonstra que os nucleotídeos iniciais e finais não puderam ser detectados, em contrapartida o alinhamento das amostras constatou que a mananase predita de *C. byssicola* (BN869_T00006860) identificada utilizando o banco de dados obtido por Karlsson e colaboradores (2015) não contém algumas regiões encontradas na amostra sequenciada.

```

sequenciamento      -----ACAGGCGGGTACTTGGTGC-TACTTCTGT CAGGGCAGCAACC
BN869_T00006860_1  ATGCGCTTCAATTGTGTCCAAGCGGTACCTTGGTGCCTACTTCTGT CAGAGGCAGCAACC
                      ** ** *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

sequenciamento      GCGGTCCCTCATCCCCGAAATCAGGTTCTCCGGGTTCTGTTACGACTGAAGGTGGGAAG
BN869_T00006860_1  GCGGTCCCTCATCCCCGAAATCAGGTTCTCCAGGTTTTGTTACGACTGAAGGTGGGAAG
                      * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

sequenciamento      TTCAAGTTGGACGGGAAAGACTTTTACTTTGCCGGGTCCAATGCGTATTATTTCCCTTTC
BN869_T00006860_1  TTCAAGTTGGATGGGAAAGACTTTTACTTTGCCGGATCCAATGCGTATTATTTCCCTTTC
                      * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

sequenciamento      TCTGGTGTGAGTGTCAACCGTTGTGTATAATAGAGCAACCGCAGACTGATACTTGTGCT
BN869_T00006860_1  TCTGGT-----
                      * * * * *

sequenciamento      CCAGACGGATGAAGATGTCGAAAAGGGGCTGAAGGCAGCCCGCAGGCAAAACTCAAGGT
BN869_T00006860_1  ---ACGGACGAAGATATCGAAAAGGGGCTGAAGGCAGCCCGTGAGGCAAAACTCAAGGT
                      * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

sequenciamento      ATTCGACCTGGGGATTCAACGACAAGAATGTCACCTACAATCCCAGCGGTCTTCCCAA
BN869_T00006860_1  GTTCGACCTGGGGATTCAACGACAAGAATGTCACCTACAATCCCAGCGGTCTTCCCAA
                      * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

sequenciamento      GTATGGTGACGAGGGTCTGGAGCCACCGAGGTCGTCTTCAACGATGGGACAATGGGAA
BN869_T00006860_1  ATATGGTGACGAGGGTCTGGAGCCACCGAGGTCGTCTTCAACGATGGGACAATGGGAA
                      * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

sequenciamento      CTCCACAATCGACGTCACTCCCTTTGACCGAGTAGTAGCAGCCGAGAGAAGAACGACAT
BN869_T00006860_1  ATCCAAAATCGACGTCACTCCCTTTGACCGAGTAGTGTGCGCCGAGAGAAGAACGACAT
                      * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

sequenciamento      CAAGCTCTTGGTTGCGCTGACTAACAAC TGGGCCGACTATGGAGGCTCTGATGTTTATGT
BN869_T00006860_1  CAAGCTCTTAGTTGCGCTGACGAACAAT TGGGCCGACTATGGAGGCTCTGATGTTTATGT
                      * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *  * * * * *

```

continua...

continuação...

```

sequenciamento          CGTGAATCTTGCGGCCAGTATCATGACGATGTCAGTATTCATCCCAGACACAGTCCC GG
BN869_T00006860_1      CGTGAATCTTGCGGCCAGTATCATGACGAT-----
*****

sequenciamento          GCTTTTCAATACTGACTCCTCATAGTTCATAAAGGTGCCACGAATCAAGGACGCTTACAA
BN869_T00006860_1      -----TTTACAAGGTTCCTCGAATCAAGGACGCTTTTAA
                           ** ** ***** ** ***** **

sequenciamento          GCGTTATGTCAAAGAGTTTGTGACTCGATACAAGGATTCGCCACAATCTTTGCCTGGGA
BN869_T00006860_1      GCGTTATGTCAAAGAGTTTGTGACTCGATACAAGGATTCGCCACAATCTTTGCCTGGGA
*****

sequenciamento          GGTCAAGGCTCCCATATTTGAGCCTAAAGTTTCGTGATTGAGTTCAAGCGGCTGACT
BN869_T00006860_1      G-----
*

sequenciamento          GGCGGTATAGCTTGAAATGAGCCTAGGTGCGGCGCAGACGGGTGCGAAATCTCCCGAG
BN869_T00006860_1      -----CTTGAAATGAGCCTAGATGTGGCGCAGATGGCGTGCAGAAATCTCCCGAG
*****

sequenciamento          GAGCGAAGACGGCTGCGATCCTCATGTTCTCGGCGCTTGGATTCTGAGATGAGCGCATA
BN869_T00006860_1      GAGCGAAGACGGCTGCGATCCTCATGTTCTCGGCGCTTGGATTCTGAGATGAGCGCATA
*****

sequenciamento          CATCAAGGAACTTGATCCGAACCATCTCGTAACCTGGGGTGCGAAGGCGACTTCAATAT
BN869_T00006860_1      CATCAAGGAACTTGATCCGAACCATCTCGTAACCTGGGGTGCGAAGGCGACTTCAATAT
*****

sequenciamento          CGAATCCGATGACTGGGCATATAACGGTAAGAATGGAGGAGACTTTCAGCTGACATCGC
BN869_T00006860_1      CGAATCCGATGACTGGGCATATAATGGTAAGAATGGAGGAGACTTTCAGCTGACATCGC
*****

sequenciamento          TCTCGACACCATTGACTTCGGCACCTTCCACTCGTATCCGGATTGGTGGAGCAAGACAGT
BN869_T00006860_1      TCTCGACACCATTGACTTCGGCACCTTCCACTCGTATCCGGATTGGTGGAGCAAGACAGT
*****

sequenciamento          TCTCGACACCATTGACTTCGGCACCTTCCACTCGTATCCGGATTGGTGGAGCAAGACAGT
BN869_T00006860_1      TCTCGACACCATTGACTTCGGCACCTTCCACTCGTATCCGGATTGGTGGAGCAAGACAGT
*****

sequenciamento          CGAGTGGACAGGTCAAGGATCAAGATCATGCCAAGCTGCTCGCAAGGGCAACAAGCC
BN869_T00006860_1      CGAGTGGACAGGTCAAGGATCAAGGATCATGCCAAGCTGCTCGCAAGGGCAACAAGCC
*****

sequenciamento          CGTTCTTTATGAAGAAGGTAACCTCGTAACGT--TGAACCTCCCCCTGCCACCTGTTGC
BN869_T00006860_1      CGTTCTTTATGAAGAAGGTAACCTCGTAACGT--TGAACCTCCCCCTGCCACCTGTTGC
*****

sequenciamento          AATCGTTAACTTGGGAAAAGTACGGGTGAT-----GACA--AAACCTGGAGAAAAGG
BN869_T00006860_1      AATCGTTAACTTGGGAAAAGTACGGGTGAT-----GACA--AAACCTGGAGAAAAGG
*****

sequenciamento          CAAAATTTGGGA-AGGCCAAACCCTCAGGGAAG--GAGCCCTTGGG--GGGAGGGGGCA
BN869_T00006860_1      CAAAATTTGGGA-AGGCCAAACCCTCAGGGAAG--GAGCCCTTGGG--GGGAGGGGGCA
*****

sequenciamento          AATTGGTTCCGA-----
BN869_T00006860_1      CAATGACTCTTTCACCATCTATTTGGACGATGAGGAGGCGAAAACCTGGTCTACAAACA
*****

sequenciamento          -----
BN869_T00006860_1      CGCCAAGGATATGGAGAAACTGAACCATAACTGGGGCGATCAATGACTTGGTCAAATGA

```

Figura 40. Alinhamento múltiplo utilizando a plataforma CLUSTAW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). A sequência identificada como sequenciamento foi fornecida pela macrogen. A sequência BN869_T00006860_1 faz referência a mananase predita por *C. byssicola*.

A identificação de sítios de restrição para as enzimas selecionadas dentro do gene sequenciado (dados nos mostrados), reafirma que ambas as amostras apresentam diferenças expressivas. Pode-se constatar um sítio de restrição para a enzima XbaI aos 1302 pb, o que explica a clivagem da sequência durante a digestão da amostra. Desta forma a continuidade do experimento tornou-se inviável.

ELETROELUIÇÃO

Sabido da potencialidade de *C. byssicola* em secretar proteoformas de mananases, a obtenção de mananases por meio da eletroeluição de amostras oriundas do zimograma foi uma das metodologias possíveis para a tentativa de identificação dessas proteínas por meio de espectrometria de massas. A eletroeluição é uma alternativa que tem sido amplamente utilizada para o estudo de proteínas. Nesta técnica, as zonas de proteínas são localizadas no gel, após a coloração, removidas e posteriormente são adicionadas em uma “câmara de eletroeluição” (Dunn 2004). No zimograma (Figura 41-A) podem ser detectadas cinco regiões em que o substrato manana 1% copolimerizado em gel foi degradado por enzimas que catalisam a hidrólise de componentes hemicelulósicos, ambas as cinco regiões foram excisadas e eletroeluídas (Figura 41-B).

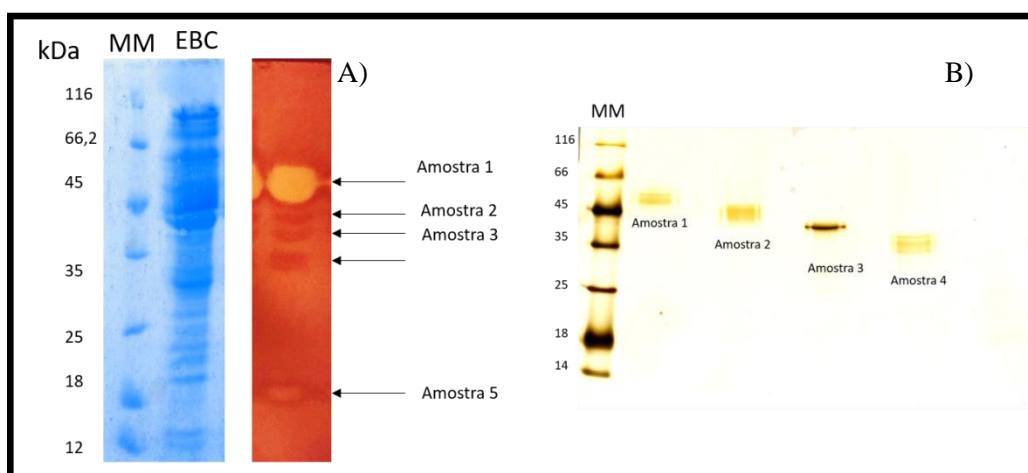


Figura 41. Eletroeluição das amostras excisadas do zimograma. A) Gel SDS-PAGE 15 % evidenciando as amostras do extrato bruto concentrado (EBC) e o zimograma destacando as amostras que foram removidas para a eletroeluição. B) Gel SDS-PAGE 15 % demonstrando as amostras eletroeluídas.

Com exceção da amostra cinco, todas as demais amostras puderam ser detectadas no gel SDS-PAGE (Figura 41-B). Apesar da identificação de mais de uma banda proteica para amostra 1, 2 e 4, é notório que a metodologia foi capaz não só de recuperar, mas de evidenciar o provável tamanho de todas as mananases eletroeluidas. Após a eletroeluição das proteínas, as amostras foram aplicadas em espectrômetro de massa (abordagem bottom-up) e posteriormente analisadas.

A Tabela 10 resume a identificação de proteínas na base de dados Uniprot a partir das quatro amostras analisadas. Apenas as amostras que apresentaram maiores porcentagens de cobertura foram consideradas, sendo identificadas prováveis glucanases (também conhecidas como celulases). Como é observado na Tabela 10, as proteínas eletroeluidas das três primeiras bandas da Figura 41-B correspondem a mesma glucanase (A0A0B7KAJ6), mas como é de esperar com diferente grau de cobertura. Essa diferença de cobertura pode ser devida as diferenças de massa molecular das bandas observadas na SDS-PAGE/zimograma o que pode sugerir que são fragmentos da proteólise de uma mesma enzima. A banda 4 identificou similarmente outra glucanase (A0A0B7JSV4) na base de dados de Uniprot (Tabela 10).

Quando comparamos os resultados da proteômica com as proteínas preditas do genoma de *C. rosea*, nota-se que as três primeiras amostras também corresponderam a prováveis exo-glucanases, em contrapartida a amostra quatro identificou uma possível endo-xilanase (Tabela 11). Sendo que as bandas 2 e 3 eletroeluidas identificam a mesma exo-glucanase (BN869_T00010581_1), a banda 1 identifica outra exo-glucanase (BN869_T00007862_1) e a banda 4 à endo-xilanase (BN869_T00005784_1).

Tabela 10. Identificação de mananases preditas utilizando o banco de dados do uniprot.

<i>Amostra</i>	<i>Acesso</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Massa</i>	<i>Descrição</i>
1	A0A0B7KAJ6 A0A0B7KAJ6_BIOOC	54	48239	Glucanase
2	A0A0B7KAJ6 A0A0B7KAJ6_BIOOC	81	48239	Glucanase
3	A0A0B7KAJ6 A0A0B7KAJ6_BIOOC	56	48239	Glucanase
4	A0A0B7JSV4 A0A0B7JSV4_BIOOC	26	45632	Glucanase

Tabela 11. Identificação de mananases preditas utilizando o banco de dados de *C. rosea*.

<i>Amostra</i>	<i>Acesso</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Massa</i>	<i>Descrição</i>
1	BN869_T00007862_1	39	54404	Exo-glucanase
2	BN869_T00010581_1	82	48239	Exo-glucanase
3	BN869_T00010581_1	57	48239	Exo-glucanase
4	BN869_T00005784_1	22	36587	Endo-xilanase

A não identificação de nenhum tipo de mananase entre as amostras analisadas é um resultado incompreensível. A análise feita por Gomes et al. (2020) em relação a identificação de GHs no secretoma de *C. byssicola* quando cultivado em casca de soja, mostrou uma quantidade considerável de GHs pertencentes a família 2, 5, 26 e 43. Apesar de todas essas famílias representarem as famílias compostas por mananases, de modo semelhante podem ser encontradas celulasas e xilanases nas famílias 2, 5 e 26. Desta forma, provavelmente a semelhança entre os domínios conservados para as enzimas citadas podem de alguma forma influenciar nos resultados obtidos.

A busca por informações mais específicas sobre as glucanases identificadas, utilizando a plataforma dbCAN, evidenciou que todas as três primeiras glucanases identificadas na Tabela 10 foram agrupadas na família 7 das GHs. Em contrapartida, a amostra 4, identificada como glucanase, mostrou-se agrupada dentro da família de CE 15, não correspondendo com a descrição obtida pelo banco de dados. Com relação a Tabela 11, todas as exo-glucanases também foram descritas como GH 7 e a endo-xilanase como CE.

Partindo do pressuposto que as 4 amostras identificadas fossem proteínas diferentes seria possível que todas elas fossem de fato glucanases? Na tentativa de responder a essa pergunta foi realizado um zimograma para confirmar se a atividade de mananase seria diferente da atividade da celulase e xilanase, ou se estaríamos tratando de proteínas com atividades inespecíficas. A Figura 42 evidencia o zimograma do EBC para as enzimas que degradam manana, CMC, xilana e pectina. A análise do gel deixa claro que a degradação do gel copolimerizado com substratos específicos para cada enzima produz faixas de degradação com tamanhos diferentes e certa coincidência em alguma

banda de mananase e CMCCase. A análise da migração relativa para o cálculo dos prováveis tamanhos moleculares mostrou que podem ser detectadas celulases com tamanhos de 50, 40 e 35 kDa, uma única xilanases com 15 kDa, pectinases com tamanhos de 39 e 45 kDa e mananases com tamanhos de 60, 48, 40 e 35 kDa.

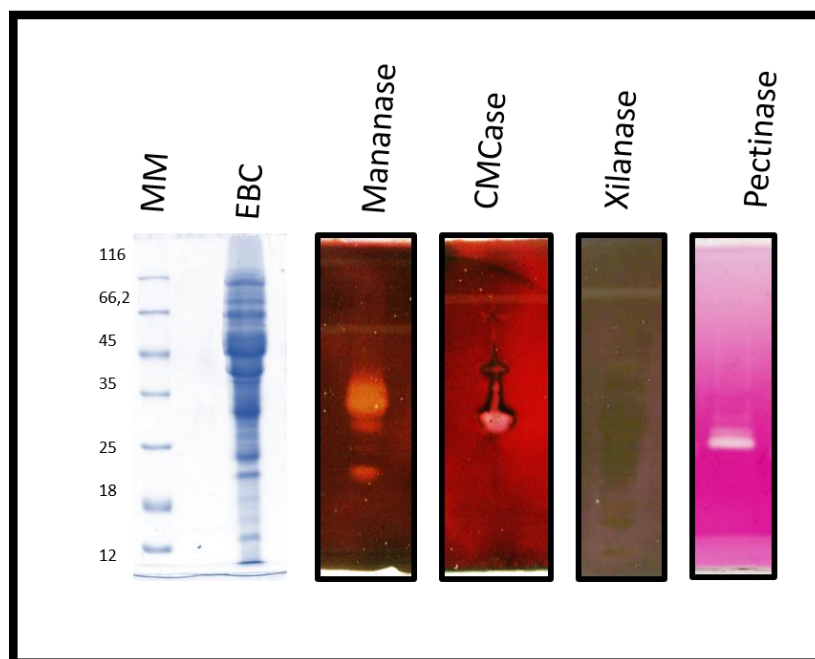


Figura 42. Gel SDS-PAGE evidenciando as amostras do extrato bruto concentrado (EBC) e o zimograma destacando a degradação do substrato manana 1% (copolimerizado pela manana 1%, carboximetilcelulose 1%, xilana oat spelt 1% e pectina1%) pelas mananases, CMCases, xilanases e pectinases, respectivamente.

Apesar da maioria das enzimas apresentarem tamanhos próximos, a sobreposição de uma única região de degradação da celulose com a mananase torna esclarecido que a não identificação de mananases pode estar relacionada com a semelhança entre os domínios conservados para as diferentes enzimas e não com a inexistência de mananases no EBC. Contudo, a falta de um banco de dados de referência para *C. byssicola* tem dificultado a confirmação da presença ou não de enzimas que degradam manana.

SEQUÊNCIAMENTO DO RNA TOTAL DE *C. BYSSICOLA* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MANANASES

A busca por sequências de mananases produzidas por *C. byssicola* resultou no sequenciamento do RNA total pela empresa macrogen (Illumina HiSeq 2000). Após processamento dos dados realizado pelo Dr. Leonardo Silva do laboratório de virologia da Universidade de Brasília, foi feita a análise dos *contigs*. A busca por GHs foi realizada utilizando o banco de dados dbCAN e, posteriormente, foi feita a anotação da provável enzima de acordo com o banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As análises das GHs que integram as mananases, galactosidases, celulases, xilanases, pectinases e arabinofuranosidases, foram executadas considerando apenas as famílias dessas enzimas descritas pelo CAZy (Tabela 12). Com relação à anotação de mananases, foi possível identificar mananases que abarcam as famílias 2, 5, 113 e 164. Sendo identificadas três mananases para a família GH 2, duas mananases que integram a família GHs 5 e uma mananase que compõe as famílias GHs 113 e 164, respectivamente. As mananases identificadas pelo dcCAN compoem as famílias 147 e 158, na verdade podem não serem de fato essas enzimas, uma vez que para essas famílias são descritas apenas β -galactosidases e β -glucosidases, respectivamente. A observação dos *contigs* que correspondem as mananases detectadas, revela que apesar de serem encontradas 7 possíveis mananases nas famílias citadas acima, apenas três *contigs* são apontados (>5_1_contig_19008 (acesso KPM37442.1) e >5_1_contig_5487 (acesso KPM45420.1) e (>5_1_contig_3352 (acesso KFH47185.1). A identificação de apenas três *contigs* relacionados com a atividade de mananase evidencia que as múltiplas mananases observadas no zimograma, provavelmente são codificadas por três genes. Desta forma os vários tamanhos de mananases identificadas no zimograma podem estar relacionados ao processamento do RNA mensageiro ou por meio de modificações pós-traducionais (Badhan et al. 2007).

Tabela 12. Anotação das prováveis enzimas identificadas em cada família de GHs. A identificação das GHs a priori foi realizada utilizando a plataforma dbCAN e posteriormente as GHs foram comparadas com outras proteínas no bando de dados do NCBI para a anotação da proteína predita.

GH	CONTIG	DESCRIÇÃO	ACESSO
1	>5_1_contig_872	beta-glucosidase [<i>Fusarium austroafricanum</i>]	KAF4444277.1
1	>5_1_contig_2167	endo-1,4-beta-xilanase [<i>Fusarium albosuccineum</i>]	KAF4461279.1
1	>5_1_contig_15249	beta-glucosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH48949.1
1	>5_1_contig_16943	endo-1,4-beta-xilanase [<i>Trichoderma lentiforme</i>]	KAF3070142.1
1	>5_1_contig_19394	beta-glucosidase [<i>Trichoderma harzianum</i>]	ART28553.1
1	>5_1_contig_19864	beta-glucosidase [<i>Fusarium tjaetaba</i>]	XP_037202737.1
1	>5_1_contig_30801	beta-glucosidase [<i>Saitozyma sp.</i> JCM 24511]	GFZ48987.1
1	>5_1_contig_33960	beta-glucosidase [<i>Fusarium denticulatum</i>]	KAF5679124.1
2	>5_1_contig_258	beta-galactosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM41021.1
2	>5_1_contig_979	beta-galactosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH40945.1
2	>5_1_contig_2198	beta-galactosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45282.1
2	>5_1_contig_3352	beta-manosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH47185.1
2	>5_1_contig_5332	beta-galactosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45282.1
2	>5_1_contig_5487	endo-1,4-beta-manosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45420.1
2	>5_1_contig_7529	beta-galactosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45282.1
2	>5_1_contig_10322	beta-galactosidase [<i>Colletotrichum spinosum</i>]	TDZ40433.1
2	>5_1_contig_19008	endo-1,4-beta-manosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM37442.1
2	>5_1_contig_30072	beta-galactosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45282.1
3	>5_1_contig_10187	beta-glucosidase [<i>Trichoderma parareesei</i>]	OTA01498.1
3	>5_1_contig_24288	beta-glucosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH43136.1
3	>5_1_contig_30802	beta-glucosidase [<i>Fusarium agapanthi</i>]	KAF4494686.1
5	>5_1_contig_3597	beta-glucosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH47190.1
5	>5_1_contig_5487	endo-1,4-beta-manosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45420.1
5	>5_1_contig_6230	alpha-L-arabinofuranosidase [<i>Trichoderma harzianum</i>]	KKP05778.1

5	>5_1_contig_665 2	endoglucanase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH44162.1
5	>5_1_contig_694 7	endo-1,6-beta-glucosidase [<i>Neonectria</i> <i>ditissima</i>]	KPM46009.1
5	>5_1_contig_101 90	alpha-L-arabinofuranosidase [<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i>]	KKP05778.1
5	>5_1_contig_152 49	beta-glucosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH48949.1
5	>5_1_contig_169 43	endo-1,4-beta-xylanase [<i>Trichoderma</i> <i>lentiforme</i>]	KAF3070142.1
5	>5_1_contig_190 08	endo-1,4-beta-mannosidase [<i>Neonectria</i> <i>ditissima</i>]	KPM37442.1
5	>5_1_contig_318 33	endo-1,6-beta-glucosidase [<i>Fusarium sp.</i> <i>AF-4</i>]	RSM06318.1
5	>5_1_contig_339 60	beta-glucosidase [<i>Fusarium denticulatum</i>]	KAF5679124.1
6	>5_1_contig_138 99	celobiose [<i>Fusarium phyllophilum</i>]	KAF5570801.1
6	>5_1_contig_216 16	endo-glucanase [<i>Fusarium langsethiae</i>]	KPA37439.1
7	>5_1_contig_142 99	endo-glucanase [<i>Fusarium floridanum</i>]	RSL86907.1
7	>5_1_contig_269 65	exo-glucanase [<i>Fusarium proliferatum</i>]	XP_011316255.1
10	>5_1_contig_216 7	endo-1,4-beta-xylanase [<i>Fusarium</i> <i>heterosporum</i>]	KAF5663707.1
10	>5_1_contig_659 1	alpha-L-arabinofuranosidase [<i>Neonectria</i> <i>ditissima</i>]	KPM34560.1
11	>5_1_contig_813 6	endo-1,4-beta-xylanase [<i>Fusarium</i> <i>heterosporum</i>]	KAF5662544.1
11	>5_1_contig_273 88	endo-1 4-beta-xylanase [<i>Fusarium sp. NRRL</i> <i>52700</i>]	KAF5625988.1
12	>5_1_contig_178 2	endo-glucanase [<i>Clonostachys rosea</i>]	AAM77707.1
12	>5_1_contig_275 70	endo-glucanase [<i>Clonostachys rosea</i>]	AAM77709.1
16	>5_1_contig_460 9	beta-glucanase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH48231.1
16	>5_1_contig_222	1,3-beta-glucosidase [<i>Purpureocillium</i> <i>lilacinum</i>]	Purpureocillium lilacinum
16	>5_1_contig_678	endo-1,3-beta-glucosidase [<i>Trichoderma</i> <i>lentiforme</i>]	KAF3071532.1
16	>5_1_contig_262 0	endo-1,3-beta-glucanase [<i>Fusarium</i> <i>bulbicola</i>]	KAF5965113.1
16	>5_1_contig_290 3	endo-1,3(4)-beta-glucanase [<i>Fusarium</i> <i>albosuccineum</i>]	KAF4466318.1
16	>5_1_contig_118 17	endo-13(4)-beta-glucanase [<i>Fusarium</i> <i>albosuccineum</i>]	KAF4472053.1
16	>5_1_contig_151 53	endo-1,3-beta-glucosidase [<i>Tolyopocladium</i> <i>paradoxum</i>]	POR33270.1

16	>5_1_contig_267 82	xilanase [<i>Fusarium langsethiae</i>]	KPA43745.1
16	>5_1_contig_278 03	endo-1,3(4)-beta-glucanase [<i>Tolyposcladium ophioglossoides</i> CBS 100239]	KND89754.1
16	>5_1_contig_289 16	endo-1,3(4)-beta-glucanase [<i>Fusarium heterosporum</i>]	KAF5661530.1
17	>5_1_contig_359 7	glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like protein [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH47190.1
17	>5_1_contig_540 3	putative beta-glucosidase btgE [<i>Fusarium culmorum</i>]	PTD12287.1
17	>5_1_contig_772 5	endo-beta-1,3-glucanase [<i>Purpureocillium lilacinum</i>]	XP_018173927.1
17	>5_1_contig_100 82	1,3-beta-glucosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH46577.1
30	>5_1_contig_120 64	endo-beta-1,4-xilanase [<i>Trichoderma guizhouense</i>]	OPB43779.1
30	>5_1_contig_276 20	endo-beta-1,4-xilanase [<i>Trichoderma guizhouense</i>]	OPB43779.1
35	>5_1_contig_998 3	beta-galactosidase [<i>Beauveria bassiana</i>]	PMB64150.1
35	>5_1_contig_280 01	beta-galactosidase [<i>Geosmithia morbida</i>]	XP_035323457.1
39	>5_1_contig_659 1	alpha-N-arabinofuranosidase [<i>Fusarium albosuccineum</i>]	KAF4462744.1
39	>5_1_contig_276 20	endo-beta-1,4-xilanase [<i>Trichoderma guizhouense</i>]	OPB43779.1
42	>5_1_contig_533 2	beta-galactosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45282.1
42	>5_1_contig_169 43	endo-1,4-beta-xilanase [<i>Trichoderma lentiforme</i>]	KAF3070142.1
42	>5_1_contig_190 08	cellulose [<i>Colletotrichum orchidophilum</i>]	XP_022468434.1
45	>5_1_contig_289 52	Endoglucanase [<i>Purpureocillium lilacinum</i>]	XP_018173442.1
54	>5_1_contig_623 0	arabinosidase [<i>Pholiota molesta</i>]	KAF8200081.1
54	>5_1_contig_930 6	alpha-L-arabinofuranosidase [<i>Trichoderma harzianum</i>]	KKP05778.1
54	>5_1_contig_101 90	alpha-L-arabinofuranosidase [<i>Trichoderma virens</i>]	AHC03897.1
55	>5_1_contig_132 08	beta-1,3 exoglucanase [<i>Fusarium bulbicola</i>]	KAF5983755.1
55	>5_1_contig_142 05	beta-1,3-glucanase [<i>Acremonium</i> sp. OXF C13]	AAW47927.1
81	>5_1_contig_198 26	endo-1,3-beta-glucanase [<i>Purpureocillium lilacinum</i>]	Escovopsis weberi
113	>5_1_contig_19008	endo-1,4-beta-manosidase [<i>Verticillium alfalfae</i> VaMs.102]	XP_003005982.1
128	>5_1_contig_359 7	endo-1,3-beta-glucosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH47190.1

130	>5_1_contig_192 69	endo-1,4-beta-xilanase [<i>Pochonia chlamydosporia</i> 170]	XP_022285477.1
137	>5_1_contig_264 21	arabinofuranosidase [<i>Metarhizium anisopliae</i>]	KAF5133083.1
147	>5_1_contig_19008	endo-1,4-beta-manosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM37442.1
148	>5_1_contig_262 8	cellulase [<i>Fusarium heterosporum</i>]	OBS22702.1
157	>5_1_contig_540 3	beta-glucosidase [<i>Fusarium albosuccineum</i>]	KAF4458212.1
158	>5_1_contig_3352	beta-mannosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45849.1
158	>5_1_contig_445 6	exo-beta-D-glucosaminidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH44367.1
158	>5_1_contig_540 3	beta-glucosidase [<i>Fusarium albosuccineum</i>]	KAF4458212.1
158	>5_1_contig_100 82	1,3-beta-glucosidase [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH46577.1
158	>5_1_contig_190 08	1,3-beta-glucosidase-like protein [<i>Acremonium chrysogenum</i> ATCC 11550]	KFH46577.1
164	>5_1_contig_5487	endo-1,4-beta-manosidase [<i>Neonectria ditissima</i>]	KPM45420.1

A abundância de celulasas (27 celulasas anotadas) em relação as demais enzimas, pode ser explicada pela quantidade de famílias já descritas para essas enzimas. Apenas para as endo-glucanases são descritas 24 famílias no banco de dados CAZy. Além do mais, quando avaliamos o principal componente dos resíduos lignocelulósicos a celulose é sem dúvidas o componente encontrado com maiores porcentagens. Algumas enzimas relacionadas à degradação de xilanas também foram identificadas em uma quantidade considerável, totalizando 12 xilanases anotadas entre as GHs. Com relação as galactosidases podem ser anotadas 10 enzimas, estando a maioria presente na família de GH 2. Por fim, nenhuma pectinase foi detectada; no entanto, as enzimas que removem os substituintes laterais da xilana e pectina (as arabinases ou arabinosidases) foram encontradas.

ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO #2:

Devido aos resultados inconclusivos durante os estudos e análises de identificação de mananases por espectrometria de massas, biologia molecular e sequenciamento do cDNA, decidiu-se adotar uma estratégia cromatográfica mais abrangente e combinada para tentar isolar algumas das mananases presentes no extrato

bruto. Para isso, volumes maiores de cultivo foram realizados seguindo a metodologia do capítulo 2.

O extrato bruto concentrado por ultrafiltração, em membrana de retenção de 30 kDa, foi submetido à cromatografia em coluna de DEAE *Sepharose Fast Flow* em duas condições de pH (pH 5 e pH 7), com o objetivo de identificar o melhor pH para ligação das proteínas à matriz. A Figura 43 mostra o resultado de ambas as purificações. Pode-se observar que em ambas as purificações dois picos de proteína eluem dentro do gradiente, e o resultado em pH 5 foi mais eficaz e eficiente na ligação das proteínas à matriz. Por este motivo, a condição experimental em pH 5 foi selecionada para realizar a primeira etapa de captura de proteína no processo cromatográfico.

A análise das atividades enzimáticas em todas as frações de eluição é mostrada na Figura 44. Em ambos os perfis cromatográficos, observa-se que as atividades enzimáticas estão concentradas nas frações de ambos os picos de eluição das proteínas (pico I e pico II). Dois picos de atividade de mananase são observados e correspondem aos dois picos de eluição de proteínas, sendo que esses estão mais bem delimitados na condição de pH 5 (Figura 44-B). Além disso, nesta condição, a atividade de mananase no pico 2 contém menos contaminantes (sendo observada apenas atividade de xilanase) em relação ao pico 1 (Figura 44-B). A análise da composição de proteínas por SDS-PAGE indica a presença de bandas em três regiões de massas moleculares. A pH 7, as proteínas em ambos picos se concentram entre 25-39 kDa e 41-100 kDa (SDS-PAGE Figura 45-B poços 1 F22 e F28). No entanto, as frações obtidas em pH 5 apresentam distribuições em três regiões menores de 26 kDa, 25-39 kDa e 41-100 kDa (SDS-PAGE Figura 45-B poços 2 F22 e F28). Ademais, foi constatado a presença de uma banda abundante de proteína de aproximadamente 30 kDa no pico 2 de eluição.

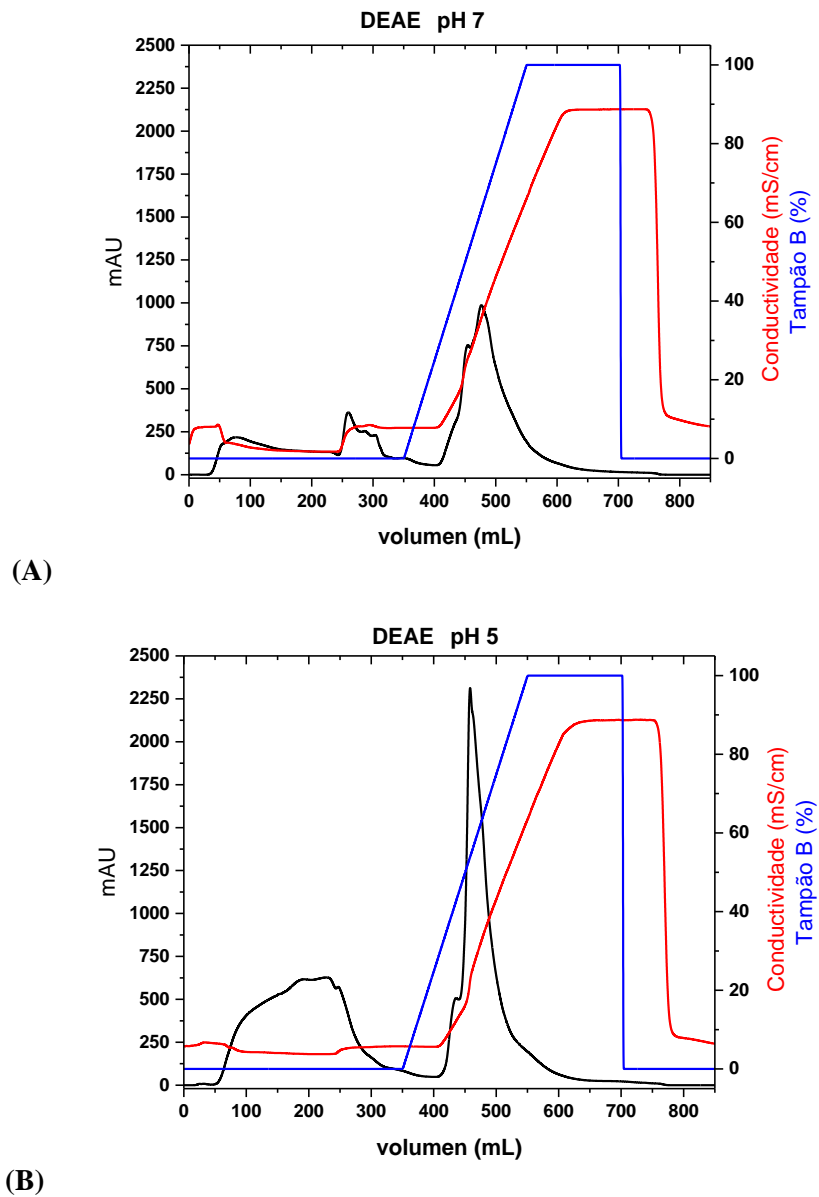


Figura 43. Cromatografias de troca aniônica em DEAE Shepharose Fast Flow, em tampão fosfato de sódio pH 7 (A) e tampão acetato de sódio pH 5 (B). A composição de proteínas por SDS-PAGE e as atividades enzimáticas das frações eluídas foram analisadas e apresentadas na Figura 44.

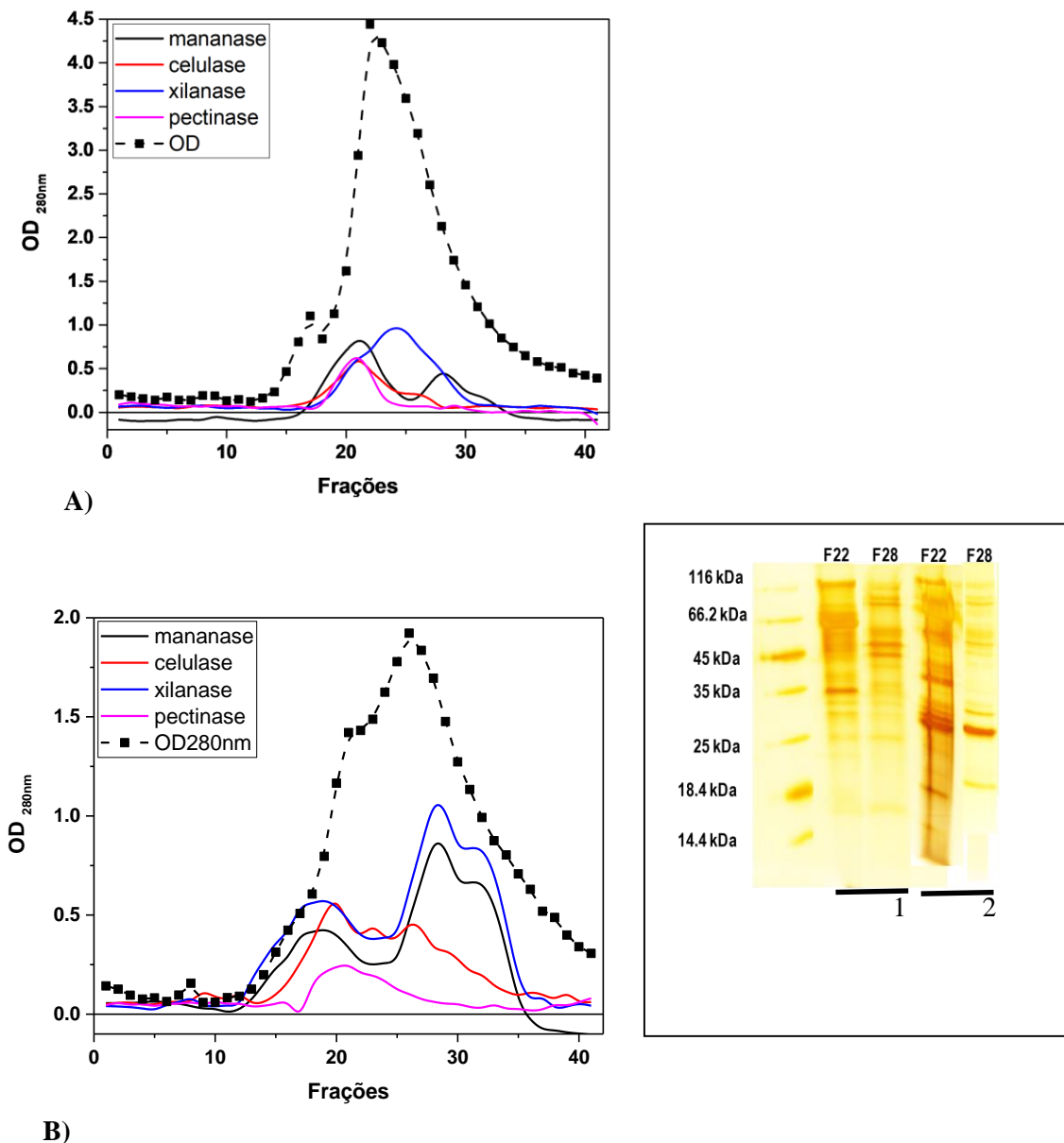


Figura 44. Atividades enzimáticas das frações cromatográficas da troca aniônica em DEAE Sheparose Fast Flow em tampão fosfato de sódio pH 7 (A) e tampão acetado de sódio pH 5 (B). A composição de proteínas por SDS-PAGE 15% das frações de maior absorvância dos picos I (F22) e II (F28) nas condições pH 7(1) e pH 5 (2) são apresentadas à direita da Figura B.

As frações proteicas do pico 1 (DEAE_P1) e 2 (DEAE_P2) da DEAE *Sepharose Fast Flow* a pH 5 foram submetidas a sucessivas cromatografias de trocas aniônicas e catiônicas em pH 5 com o objetivo de isolar as frações de mananases de ambos picos. O

pico DEAE_P1 foi separado em dois volumes iguais e aplicados em diferentes colunas de trocas aniônica QXLFF e catiônica SPFF, respectivamente. Os resultados são mostrados na Figura 45 onde pode-se observar que não há eluição da proteína no gradiente da coluna de SPFF (Figura 45-B), em contrapartida, um grande pico de proteínas foi eluído durante o gradiente na QXLFF (Figura 45-A). Estes resultados indicam, como esperado, que em pH 5 praticamente todas as proteínas do pico DEAE_P1 possuem cargas negativas e, portanto, são novamente recapturadas em um trocador de ânions. Não obstante, não aconteceu separação de novos picos de eluição no gradiente aniônico (Figura 45-A) e não houve capturas de proteínas na matriz catiônica (Figura 45-B).

Quando analisadas as atividades enzimáticas das frações eluídas em cada cromatografia, pode-se observar que praticamente não há atividade nas frações da SPFF (Figura 46-A). Apenas pequenos picos de atividade de mananases são observados na fração não fixada, como também atividade de pectinase no primeiro dos três picos de proteínas eluídas. A análise da composição das proteínas por SDS-PAGE 15 % das frações não fixadas à coluna (F2-9), incluída a F3 com atividade mananase, mostraram composição similar de proteínas com bandas a 25, 35, 40, 50, 60, 70 e 100 kDa aproximadamente (SDS-PAGE Figura 46-B poços SPFF F2, F3, F9). Entretanto, a composição proteica dos três picos de eluição do gradiente diferem entre si, com tamanhos de 25, 35 e 50 kDa para o pico SPFF_1; de 35 e 40 kDa para o pico SPFF_2 e de 30, 35, e 40 kDa para o pico SPFF_3. A análise da fração SPFF_1 por espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostrou a presença de moléculas com diâmetros hidrodinâmicos de 4 e 6,5 nm correspondentes a massas moleculares de 19 e 53 kDa, respectivamente de acordo com as triplicatas analisadas (Figura 47-A e Tabela). Essas massas moleculares estimadas por DLS coincidem com as estimadas por SDS-PAGE para essa fração de proteínas eluídas. As análises das frações SPFF_2 e SPFF_3 pelo DLS sugeriu a presença de grandes moléculas ou agregados com diâmetros de 122 e 91 nm correspondentes a massas de 51 000 e 26 000 kDa, respectivamente (Figura 47-B e Tabela).

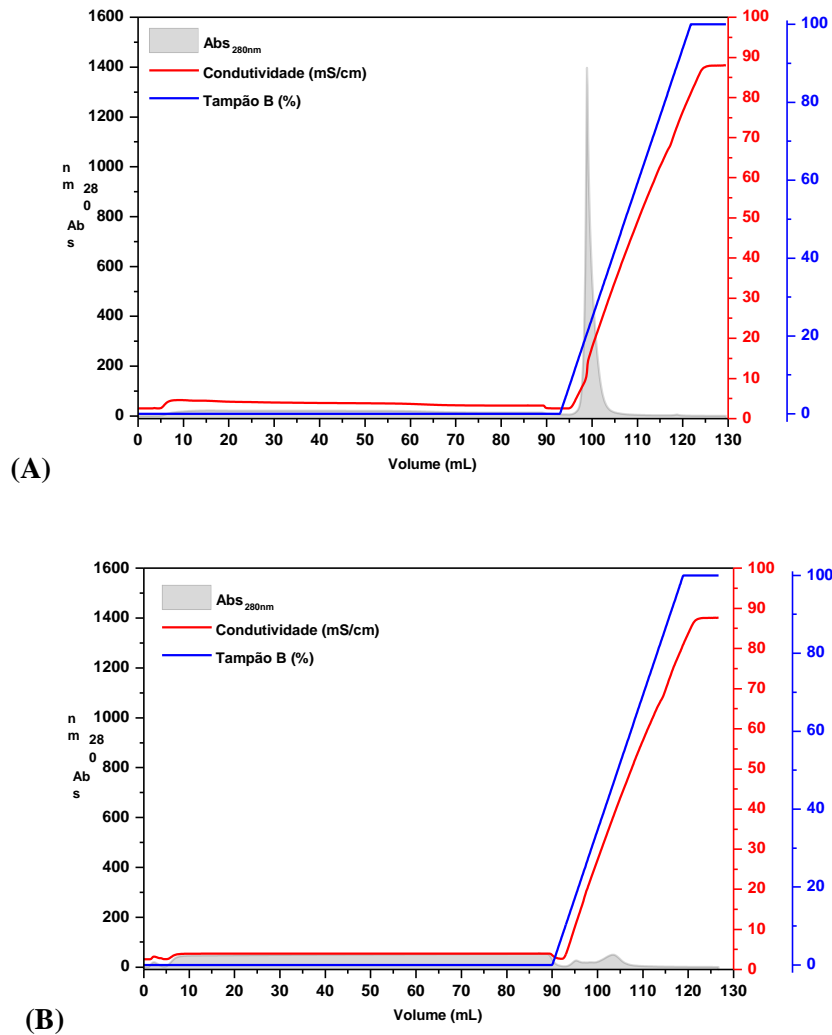
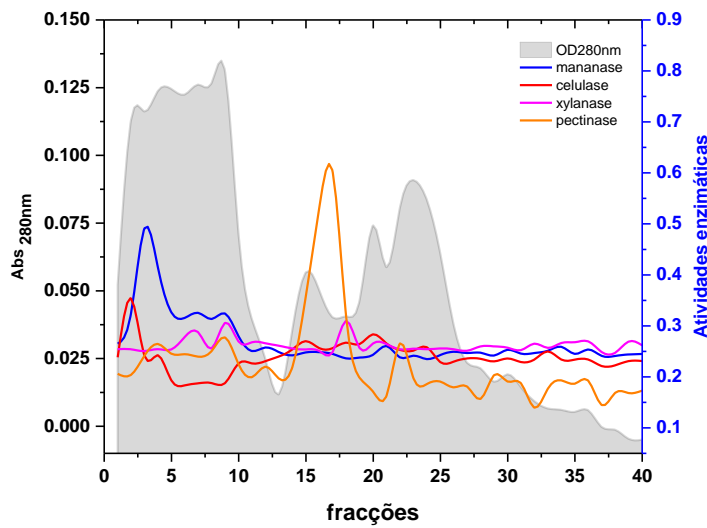
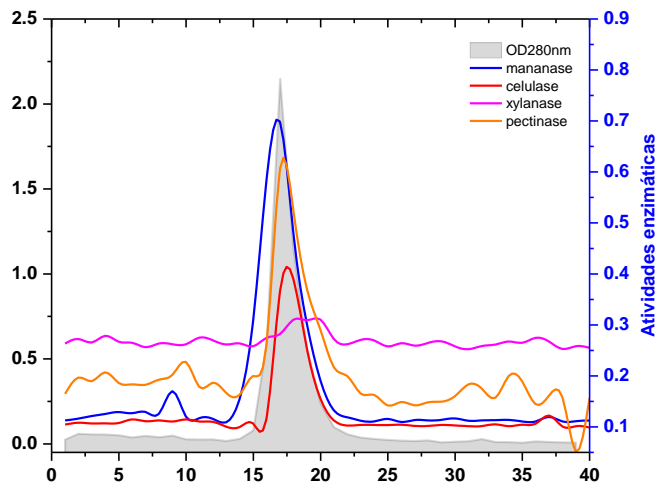


Figura 45. Cromatografias de troca aniônica (A) e catiônica (B) em QXL e SP Sheparose Fast Flow da fração DEAE_P1, respectivamente. Em tampão acetato de sódio pH 5. A composição de proteínas por SDS-PAGE e as atividades enzimáticas das frações eluídas foram analisadas e apresentadas na Figura 46.



(A)



(B)

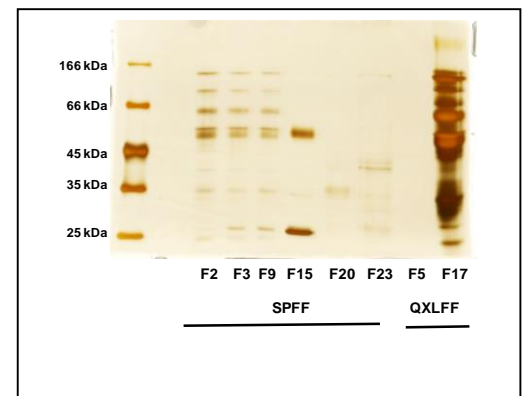
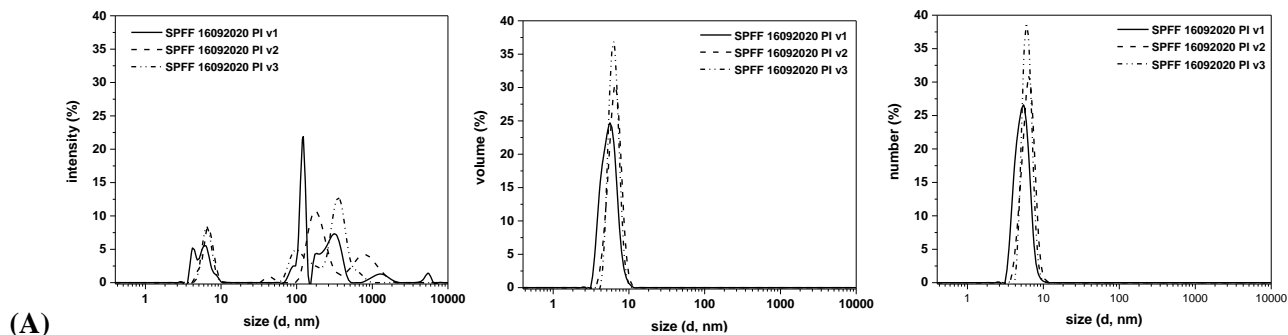
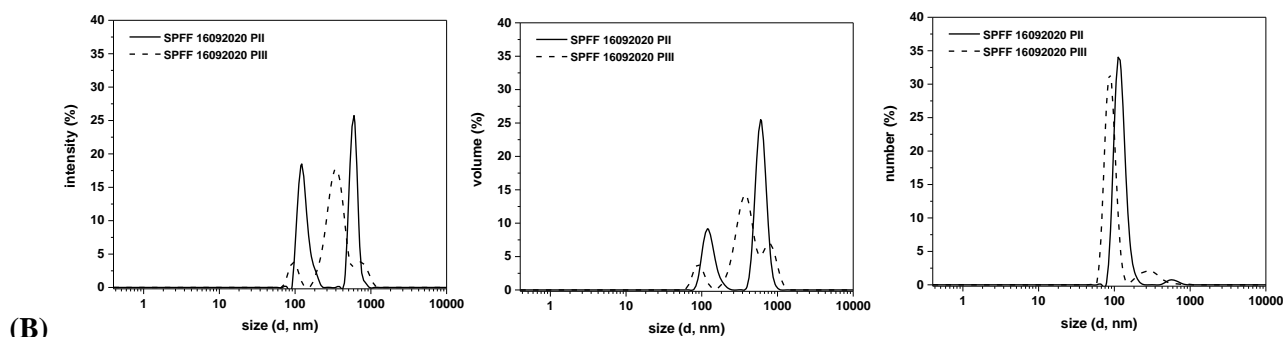


Figura 46. Atividades enzimáticas das frações cromatográficas de troca catiônica (A) e aniônica (B) em SP e QXL Shearose Fast Flow, da fração DEAE_P1 respectivamente. As composições das proteínas por SDS-PAGE 15 % das frações de maior absorvância são apresentadas à direita da Figura B.



Leituras SPFF 16092020	diametro (nm)	MW (kDa)	Polydispersity	Mass (%)
PI v1	4.19 ± 0.32	19.0 ± 6.2	monodisperse	100
PI v2	6.50 ± 1.07	53.1 ± 17.5	monodisperse	99
PI v3	6.50 ± 0.78	53.1 ± 15.9	monodisperse	99



Leituras SPFF 16092020	diametro (nm)	MW (kDa)	Polydispersity	Mass (%)
PII	122.40 ± 22.88	51000 ± 7020	monodisperse	98
PIII	91.28 ± 12.46	25700 ± 7970	monodisperse	98

Figura 47. Análise por DLS das frações eluídas da cromatografia de troca catiônica SPFF da fração DEAE_P1. (A) Distribuição de intensidade, volume, e número de moléculas nas triplicatas da fração SPFF_1. (B) Distribuição de intensidade, volume, e número de moléculas nas frações SPFF_2 e SPFF_3. Nas Tabelas anexas são resumidos os diâmetros hidrodinâmicos e as massas moleculares estimadas das partículas.

Em contrapartida, no grande pico de eluição de proteínas da QXLFF, pelo menos três atividades enzimáticas principais são observadas: mananase, celulase e pectinase (Figura 46-B). A análise do perfil de proteína por SDS-PAGE 15 % indicou a ausência de proteína na fração não fixada e presença de um grande número de proteínas no pico de eluição QXLFF com massas moleculares distribuídas em um amplo espectro de massa de 25 kDa a 100 kDa (Figura 46-B). Apesar da abundância de proteínas com diferentes pesos moleculares, quando essa fração foi analisada por DLS, apenas a presença de uma população de partículas com diâmetro hidrodinâmico de 7 nm e massa molecular de 75 kDa foi identificada (Figura 48). Provavelmente as outras proteínas identificadas por SDS-PAGE formam agregados em partículas maiores as quais são eliminadas durante a centrifugação das amostras antes da leitura ou escapem do limite máximo de detecção do equipamento DLS.

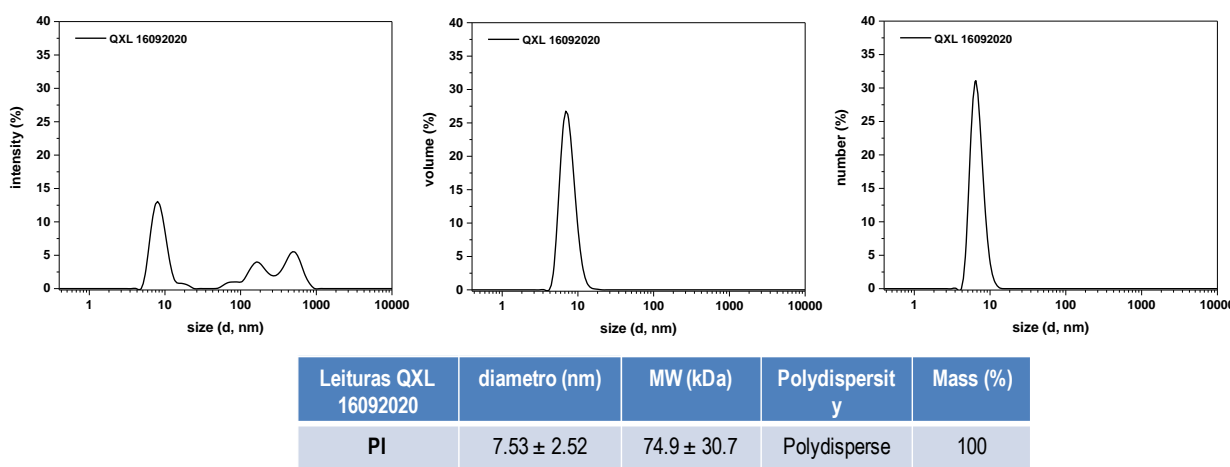


Figura 48. Análise por DLS das frações eluídas na cromatografia de troca aniônica QXLFF da fração DEAE_P1. Distribuição de intensidade, volume, e número de moléculas na fração QXLFF. Na Tabela anexa são resumidos os diâmetros hidrodinâmicos e as massas moleculares estimadas das partículas.

As frações de proteínas do pico 2 (DEAE_P2) da DEAE *Sepharose Fast Flow* a pH 5 foram separadas em dois volumes iguais e aplicadas em diferentes colunas de troca aniônica QXLFF e catiônica SPFF no mesmo pH, respectivamente. Os resultados são mostrados na Figura 49 e demonstram, resultados similares aos Pico DEAE_P1, em que não há eluição da proteína no gradiente da coluna de SPFF (Figura 49-A), mas há eluição de um grande pico de proteínas no de QXLFF (Figura 49-B). Portanto e como esperado,

a pH 5, praticamente todas as proteínas do pico DEAE_P2 também possuem cargas negativas e não são capturadas em um trocador catiônico como o SPFF (Figura 49-A). Não ocorrendo separação de novos picos no gradiente aniônico (Figura 49-B).

Quando analisadas as atividades enzimáticas das frações eluídas em cada cromatografia, pode-se observar que praticamente não há atividade nas frações da SPFF (Figura 50-A) e a composição de proteína por SDS-PAGE de algumas frações não fixadas (F4, 9, 20) mostrou composição similar de proteínas com bandas a 25, 30, 40, 45, 50, 60, 66 e 100 kDa aproximadamente (SDS-PAGE Figura 50-B poços SPFF F4, F9, F20). No caso das frações maiores que a F33, nenhuma banda de proteína foi observada no gel. Porém quando as frações F29-33 do pequeno pico de eluição em SPFF foram analisadas por DLS, observou-se a presença de um conjunto de moléculas pequenas com diâmetros hidrodinâmicos de 3 nm correspondente a massa molecular de 9,5 kDa (Figura 51-A e Tabela). Esse resultado poderia explicar a ausência de bandas na SDS-PAGE para a fração F33 as quais poderiam ser menores do limite de separação do gel.

No grande pico de eluição das proteínas em QXLFF, pelo menos três atividades enzimáticas principais são observadas: mananase, celulase e xilanase (Figura 50-B). Quando comparamos os resultados das atividades no pico de eluição em QXL da fração DEAE_1, observamos que as atividades de mananase e celulase sempre estão presentes, porém diferem com relação as atividades de pectinase e xilanase. Isso está em correspondência com as atividades observadas nos picos de DEAE (Figura 46-B), onde no pico DEAE_1 há atividade de pectinase e no DEAE_2 de xilanase. Contraditoriamente, no pico DEAE_2 não há presença de atividade significativa de celulase (Figura 50-B). Entretanto, no pico de eluição QXLFF observamos co-atividade de celulase além de mananase e xilanase (Figura 50-B). Esse resultado pode estar relacionado ao fato de os substratos utilizados nos experimentos enzimáticos serem de composição complexa e de baixa pureza, razão pela qual provavelmente coexistem diferentes polímeros de carboidratos suscetíveis à hidrólise por diferentes tipos de enzimas.

A análise da composição da proteína por SDS-PAGE 15 % novamente indicou um grande número de proteínas no pico de eluição QXLFF com massas moleculares distribuídas em um amplo espectro de massa de 25 kDa a 100 kDa (Figura 50-B). Apesar dessa

abundância de proteínas com diferentes pesos moleculares, quando essa fração foi analisada por DLS, foi detectado apenas a presença de dois conjuntos de partículas com diâmetro hidrodinâmico de 4 e 6,5 nm e massas moleculares de 19 e 53 kDa, respectivamente (Figura 51-B e Tabela).

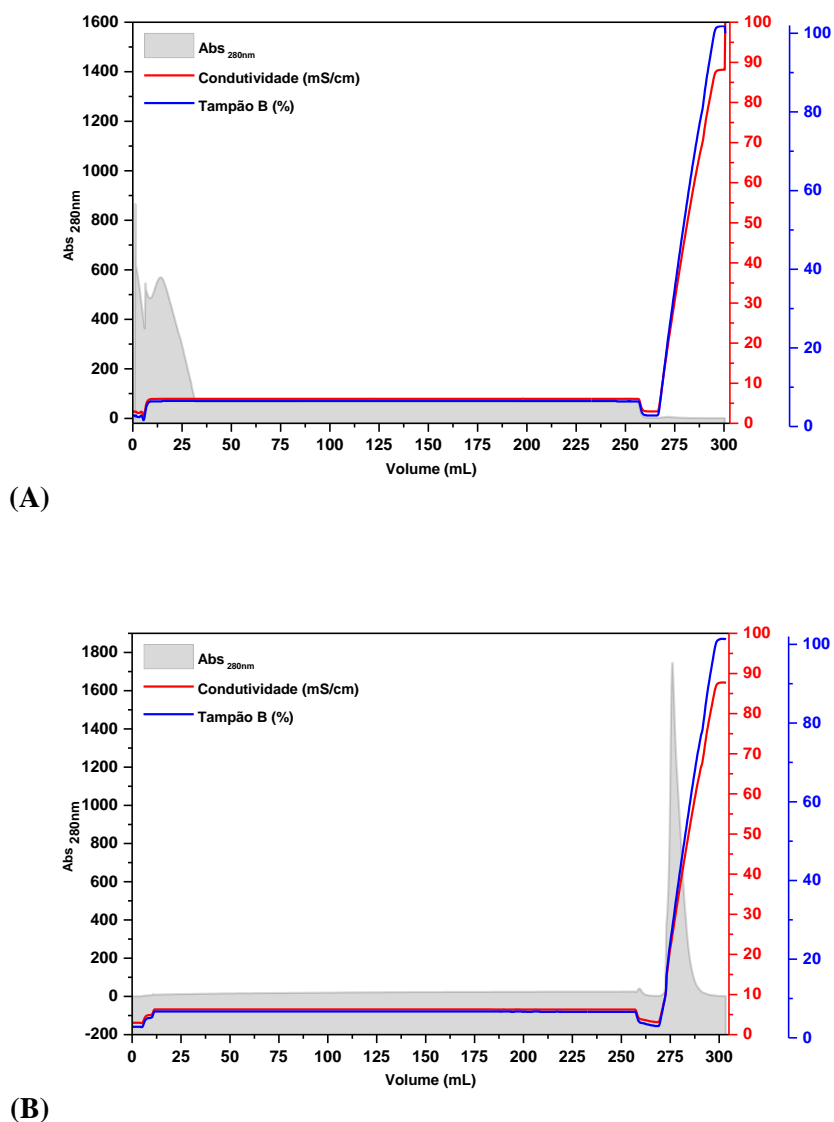
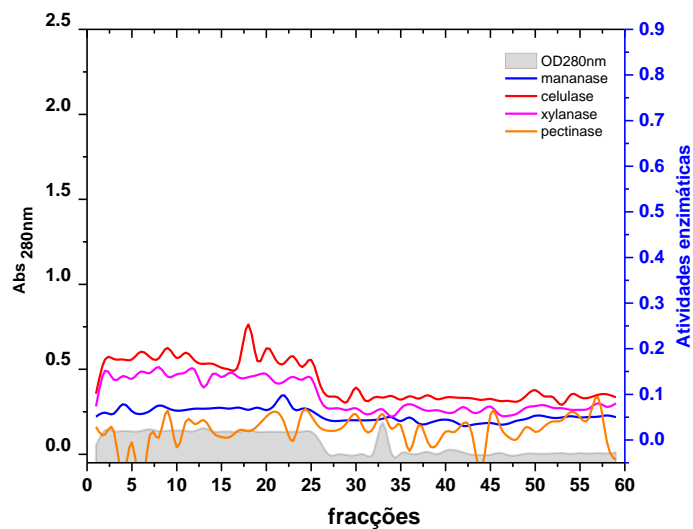
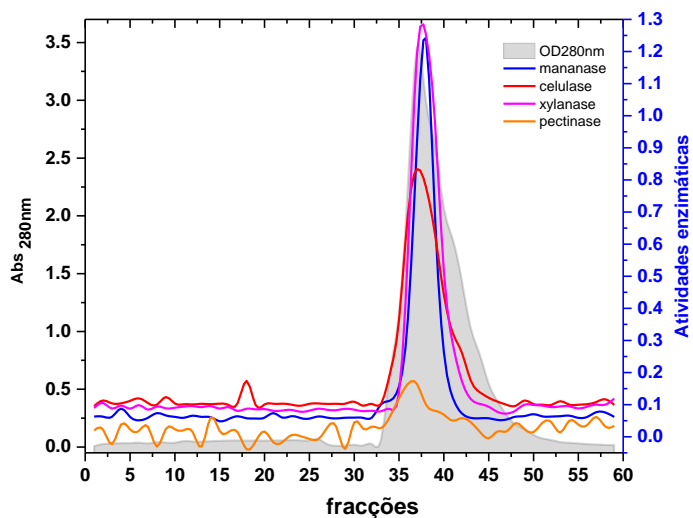


Figura 49. Cromatografia de troca catiônica (A) e aniônica (B) em SP e QXL Sepharose Fast Flow da fração DEAE_P2, respectivamente, em tampão acetato de sódio pH 5. A composição de proteínas por SDS-PAGE e as atividades enzimáticas das frações eluídas foram analisadas e



(A)



(B)

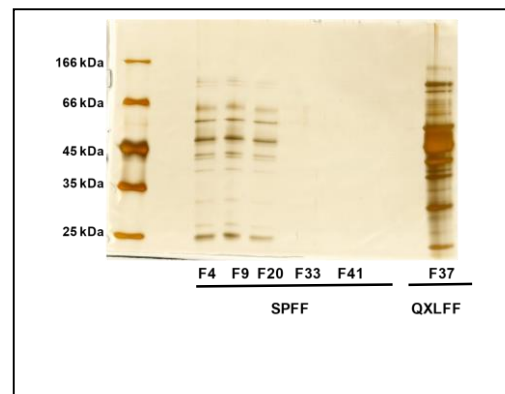
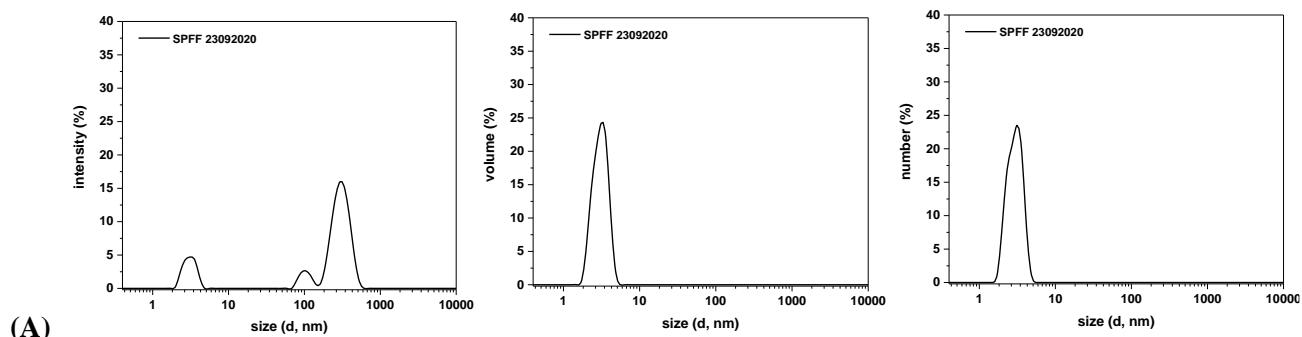
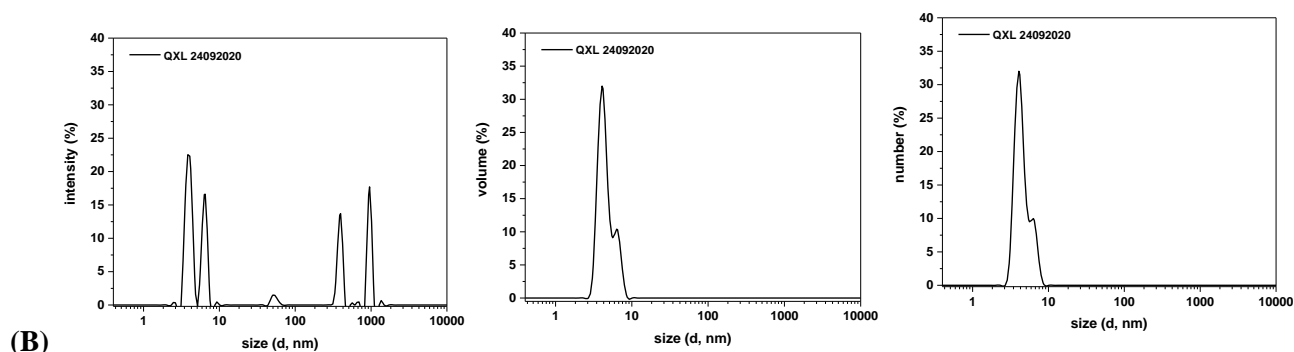


Figura 50. Atividades enzimáticas das frações cromatográficas de troca catiônica (A) e aniônica (B) em SP e QXL Sepharose Fast Flow, da fração DEAE_P2 respectivamente. A composição de proteínas por SDS-PAGE 15 % das frações de maior absorvância é apresentada à direita da Figura B. Um volume de 15 μ L das frações foram utilizadas para a preparação das amostras e a coloração do gel por prata.



Leituras SPFF 23092020	diametro (nm)	MW (kDa)	Polydispersity	Mass (%)
PI	3.12 ± 0.56	9.5 ± 2.4	monodisperse	100



Leituras QXL 24092020	diametro (nm)	MW (kDa)	Polydispersity	Mass (%)
PI	4.19 ± 0.33	19.0 ± 1.4	monodisperse	79
PII	6.50 ± 0.56	53.1 ± 4.3	monodisperse	21

Figura 51. Análise por DLS das frações eluídas da cromatografia de troca catiônica e aniônica. Distribuição de intensidade, volume, e número de moléculas da fração F29-33 da SPFF (A) e F34-38 da QXLFF (B). Nas Tabelas anexas são resumidos os diâmetros hidrodinâmicos e as massas moleculares estimadas das partículas.

Curiosamente, este resultado é semelhante ao observado na análise do pico de eluição de SPFF_1 utilizando a fração DEAE_1 (Figura 47-A e Tabela). Novamente, provavelmente as proteínas identificadas no SDS-PAGE para a fração de eluição QXLFF de DEAE_2 formem agregados em partículas maiores as quais são eliminadas durante a centrifugação das amostras antes da leitura ou escapem do limite máximo de detecção do equipamento DLS.

Devido ao fato de não ter sido possível obter uma fração pura das enzimas mananase, diferentes estratégias cromatográficas foram realizadas, como a recromatografia das frações não fixadas de cada corrida na coluna de troca iônica antagonista para capturar alguma mananase, mas infelizmente nenhuma das tentativas resultou em resultados diferentes aos já obtidos anteriormente (resultados não apresentados).

Além disso, processos cromatográficos de DEAE *fast flow* aos pH 3 e 4 também foram realizados. Os resultados mostraram que em pH 3 e pH 4 três picos de eluição foram obtidos dentro dos gradientes (picos I, II, III Figura 52-A) e (picos II, III, IV Figura 52-B), no entanto, em pH 4, um pico adicional foi observado na lavagem da coluna (pico I, Figura 52-B). As atividades enzimáticas nas frações foram muito baixas provavelmente devido aos valores extremos de pH. Porém, podem ser observadas destaques no caso da atividade da xilanase no pico III em pH 3 (Figura 53-A), e no final do pico II e início do pico III em pH 4 (Figura 53-B). A análise da composição proteica por SDS-PAGE das frações mostra uma composição baixa e heterogênea de proteína em pH 3 (Figura 54-A), porém, em pH 4 o teor de proteína é claramente mais abundante e heterogêneo (Figura 54-B). Em geral, as bandas de proteínas estão distribuídas de forma semelhante aos resultados obtidos em DEAE *Sepharose fast flow* a pH 5 e 7, com massas moleculares entre 25 e 100 kDa. Um destaque especial é que nas frações de pico III de pH 4 com atividade de xilanase, existe uma banda intensa e semipura com aproximadamente 40 kDa, o que poderia sugerir a purificação parcial de uma enzima. Estudos adicionais de pureza e identificação devem corroborar essa hipótese.

Novas etapas de purificação que incluíam princípios de exclusão molecular de filtração em gel e interações hidrofóbicas não puderam ser realizadas devido às limitações de trabalho impostas pela pandemia de COVID-19.

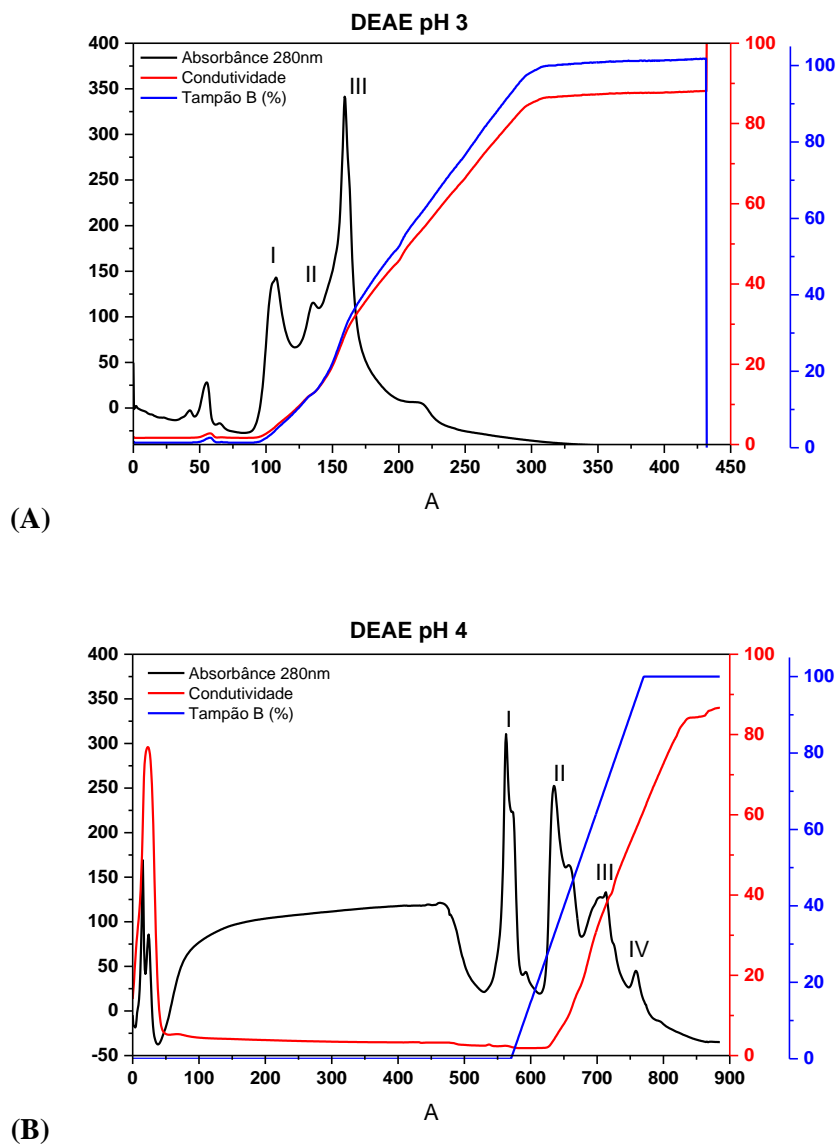
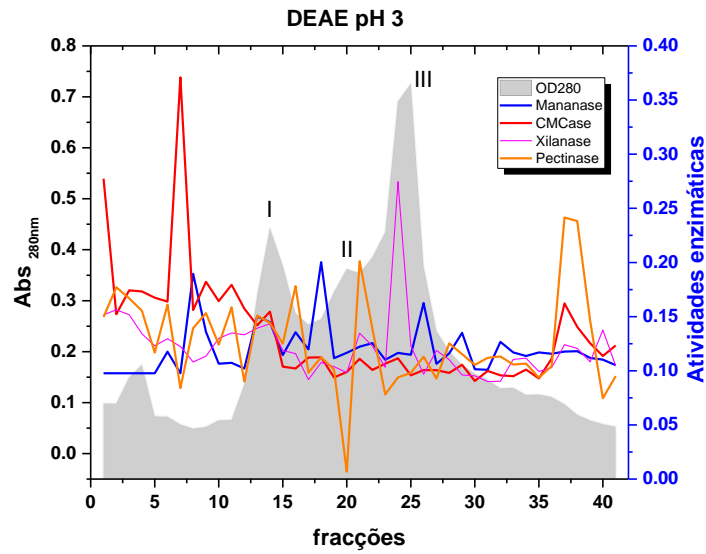
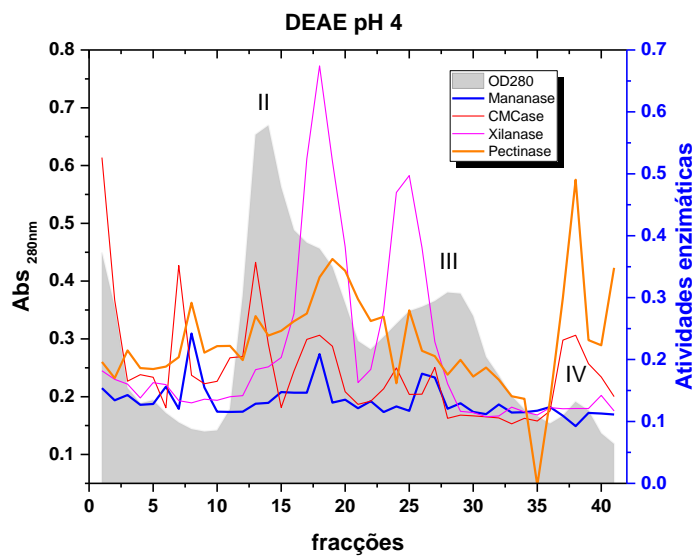


Figura 52. Cromatografias de troca aniônica em DEAE Shearose Fast Flow. Em tampão citrato de sódio pH 3 (A) e citrato de sódio pH 4 (B). A composição de proteínas por SDS-PAGE e as atividades enzimáticas das frações eluídas foram analisadas e apresentadas na Figura 54 e 53, respectivamente..



(A)



(B)

Figura 53. Atividades enzimáticas das frações cromatográficas de troca aniônica DEAE Sepharose Fast Flow. Em tampão citrato de sódio pH 3 (A) e tampão citrato de sódio pH 4 (B).

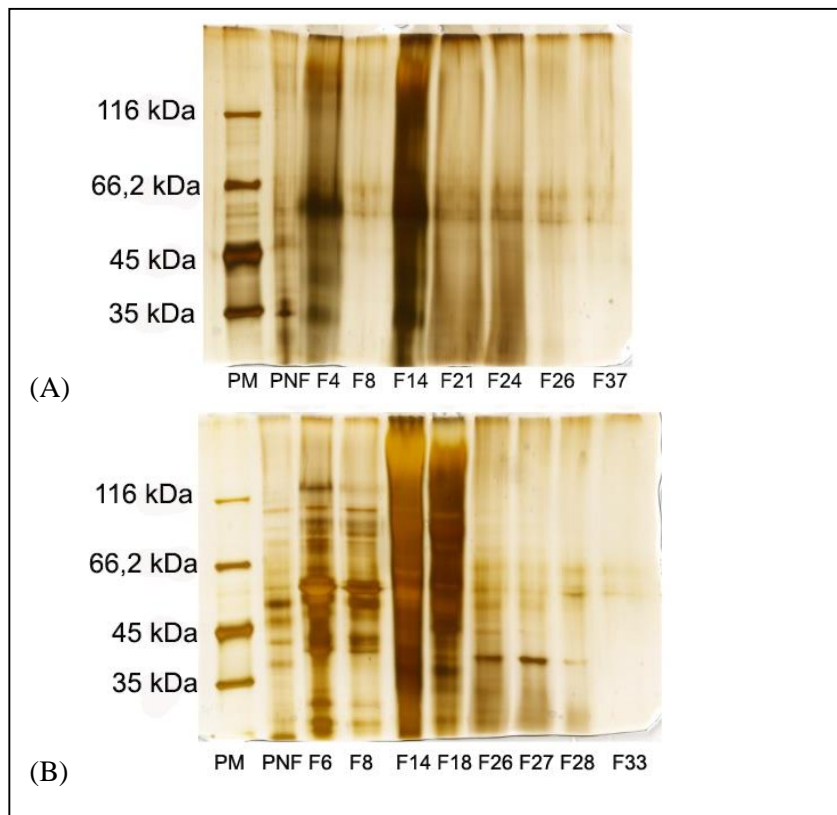


Figura 54. Composição de proteínas por SDS-PAGE 15 % das frações de maior absorvância das cromatográficas de troca aniônica DEAE Sheparose Fast Flow em tampão citrato de sódio no pH 3 (A) e pH 4 (B). Antes da preparação das amostras e coloração com o gem, uma quantidade de 500 uL das frações foram precipitadas com 500 uL da mistura acetona:metanol (1:1) a -20°C por 1h.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o extrato bruto isolado *C. byssicola* quando crescido em casca de soja mostrou-se eficaz na produção de enzimas responsáveis pela degradação da fração hemicelulósica presente na casca de soja. Entre as enzimas produzidas, a mananase exibiu atividade superior a CMCase e xilanase. A caracterização de mananases evidenciou o potencial dessas enzimas em aplicações farmacêuticas, devido a produção de oligossacarídeos, e indústrias de ração, em razão de suas propriedades em atuar em pHs ácidos.

A identificação de proteoformas de mananases, demonstrada no zimograma, ressalta a capacidade do fungo em utilizar componentes contendo manana como fonte de nutriente. Além disso, essas proteínas podem apresentar propriedades químicas que beneficiem a hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos.

Este trabalho relata, pela primeira vez, algumas propriedades físico-químicas de mananases provenientes de *C. byssicola*. Trabalhos realizados utilizando o gênero

Clonostachys mostram-se poucos informativos quanto a produção de glicosil hidrolases. A identificação de um conjunto de holocelulases compondo o genoma de *C. byssicola* evidencia o potencial deste fungo em degradar os componentes da parede celular vegetal.

Estudos a respeito de enzimas produzidas por fungos filamentosos podem contribuir para a identificação de propriedades que aumentem a eficiência da sacarificação de resíduos lignocelulósicos. Além do mais, são componentes chaves para a produção de coquetéis enzimáticos mais específicos com quantidades de enzimas reduzidas (Florencio, Colli, e Farinas 2017). A busca por propriedades que melhorem a eficiência da hidrólise de resíduos lignocelulósicos impulsiona o isolamento e a identificação de sequências de enzimas. A identificação de mananases por meio do sequenciamento do RNA total contribuiu para o reconhecimento da sequência alvo da mananase. Os estudos para a expressão heteróloga prosseguirão a fim de obter-se a proteína expressa por *K. pastoris* RFFRe a avaliação do potencial de aplicação dessas enzimas, ademais serão realizadas análises das informações proteômicas obtidas por meio da abordagem *top-down* na tentativa de identificar todas as modificações pós-traducionais encontradas no espectrograma, uma vez que essas modificações podem afetar as características de mananases.

A partir das tentativas de purificar as mananases presentes no extrato bruto usando técnicas cromatográficas de troca iônica podemos concluir:

1.- A primeira etapa cromatográfica de troca aniônica em *DEAE Sephrose fast flow* a pH 5 resulta em uma captura efetiva das mananases utilizando grandes volumes de extrato bruto concentrado de *C. byssicola*. Além disso, é possível durante o gradiente linear de eluição separar duas populações ou picos de proteínas com atividades de mananases.

2.- Os resultados da purificação das mananases com trocadores de íons a pH 5, como a *SP Sepharose fast flow* indicam que as cromatografias catiônicas não são eficazes porque não são capazes de capturar as proteínas. Além do mais, as proteínas das frações da DEAE nesse pH possuem cargas neta negativas.

3.- O uso de cromatografia de troca aniônica, como *QXL Sepharose fast flow*, garante uma captura eficiente das mananases e das outras enzimas presentes nas frações de DEAE. No entanto, nenhuma separação ou purificação dessas populações de proteínas

foi obtida durante gradientes de eluição linear. A otimização desta cromatografia em termos de pH e condições de eluição poderia garantir esta separação. A combinação de outros princípios cromatográficos, como a exclusão molecular e as interações hidrofóbicas, em futuros trabalhos poderia levar ao sucesso na purificação das mananases do extrato de *C. byssicola*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesina FC, Oluboyede OA, Onilude AA (2013) Production , purification and characterisation of a β - mannanase by *Aspergillus niger* through solid state fermentation (SSF) of *Gmelina arborea* shavings. *J Microbiol Res* 7:282–289 . doi: 10.5897/AJMR11.1106
- Anderson CT (2015) We be jammin ’: an update on pectin biosynthesis , trafficking and dynamics. *J Exp Bot* 67:495–502 . doi: 10.1093/jxb/erv501
- Atmodjo MA, Hao Z, Mohnen D (2013) Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 64:747–749 . doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105534
- Badhan AK, Chadha BS, Kaur J, Saini HS, Bhat MK (2007) Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresour Technol* 98:504–510 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.009
- Barcelos MCS, Ramos CL, Kuddus M, Rodriguez-Couto S, Srivastava N, Ramteke PW, Mishra PK, Molina G (2020) Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. *Biotechnol Lett* 42:1799–1827 . doi: 10.1007/s10529-020-02957-3
- Benocci T, Victoria M, Pontes A, Zhou M, Seiboth B, Vries RP De (2017) Biotechnology for Biofuels Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels* 10:1–25 . doi: 10.1186/s13068-017-0841-x
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99 . doi: 10.1002/elps.1150080203
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Broberg M, Dubey M, Sun MH, Ihrmark K, Schroers HJ, Li SD, Jensen DF, Durling MB, Karlsson M (2018) Out in the cold: Identification of genomic regions associated with cold tolerance in the biocontrol fungus *clonostachys rosea* through genome-wide association mapping. *Front Microbiol* 9:1–13 . doi:

- 10.3389/fmicb.2018.02844
- Buckeridge MS (2018) The evolution of the Glycomic Codes of extracellular matrices. *Biosystems* 164:112–120 . doi: 10.1016/j.biosystems.2017.10.003
- Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure , function , and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Res* 344:1879–1900 . doi: 10.1016/j.carres.2009.05.021
- Cain JA, Solis N, Cordwell SJ (2014) Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J Proteomics* 97:265–286 . doi: 10.1016/j.jprot.2013.08.012
- Canteri MHG, Moreno L, Wosiack G, Scheer AP (2011) Pectina : da Matéria-Prima ao Produto Final. *Polímeros* 22:149–157 . doi: 10.1590/S0104-14282012005000024.
- Chambers MC, MacLean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, Gatto L, Fischer B, Pratt B, Egertson J, Hoff K, Kessner D, Tasman N, Shulman N, Frewen B, Baker TA, Brusniak MY, Paulse C, Creasy D, Flashner L, Kani K, Moulding C, Seymour SL, Nuwaysir LM, Lefebvre B, Kuhlmann F, Roark J, Rainer P, Detlev S, Hemenway T, Huhmer A, Langridge J, Connolly B, Chadick T, Holly K, Eckels J, Deutsch EW, Moritz RL, Katz JE, Agus DB, MacCoss M, Tabb DL, Mallick P (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* 30:918–920 . doi: 10.1038/nbt.2377
- Chatterton S, Punja ZK (2009) Chitinase and β -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f . *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian J Microbiol* 55:356–367 . doi: 10.1139/W08-156
- Chauhan PS, Gupta N (2017) Insight into microbial mannosidases: a review. *Crit Rev Biotechnol* 37:190–201 . doi: 10.3109/07388551.2015.1128878
- Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N (2012) Mannanases : microbial sources , production , properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1817–1830 . doi: 10.1007/s00253-012-3887-5
- Chen M, Wang J, Lin L, Wei W, Shen Y, Wei D (2021) High-level expression of a β -mannanase (manB) in *Pichia pastoris* GS115 for mannose production with *Penicillium brevicompactum* fermentation pretreatment of soybean meal. *Bioprocess Biosyst Eng* 44:549–561 . doi: 10.1007/s00449-020-02467-6

- Chen X, Cao Y, Ding Y, Lu W, Li D (2007) Cloning , functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* α -mannanase in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* 128:452–461 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.11.003
- Cherubini F (2010) The biorefinery concept : using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag* 51:1412–1421 . doi: 10.1016/j.enconman.2010.01.015
- Coffman AM, Li Q, Ju L-K (2014) Effect of natural and pretreated soybean hulls on enzyme production by *Trichoderma reesei*. *J Am Oil Chem Soc* 91:1331–1338 . doi: 10.1007/s11746-014-2480-8
- Corrêa CL (2016) Estudo do transcriptoma global do fungo *Aspergillus terreus* quando cultivado em resíduos agroindustriais. Universidade de Brasília
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850–861 . doi: 10.1038/nrm1746
- Cosgrove DJ (2014) Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr Opin Plant Biol* 22:122–131 . doi: 10.1016/j.pbi.2014.11.001
- de Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS (2013) Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Res* 6:564–579 . doi: 10.1007/s12155-012-9268-1
- Dence AW, Lin SY (1992) General structural features of lignin. In: Timell TE (ed) *Methods in lignin chemistry*. Springer, Berlin, pp 1–17
- Dhugga KS, Barreiro R, Whitten B, Stecca K, Hazebroek J, Randhawa GS, Dolan M, Kinney AJ, Tomes D, Nichols S, Anderson P (2004) Guar Seed β -Mannan Synthase Is a Member of the Cellulose Synthase Super Gene Family. *Science* (80-) 303:363–366 . doi: 10.1126/science.1090908
- Dionísio M, Grenha A (2012) Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *J Pharm Bioallied Sci* 4:175–185 . doi: 10.4103/0975-7406.99013
- Doherty WOS, Mousavioun P, Fellows CM (2011) Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind Crops Prod* 33:259–276 . doi: 10.1016/j.indcrop.2010.10.022
- Dunn MJ (2004) *Electroelution of proteins from polyacrylamide gels.*, Second Edi.

Humana Press, Totowa

- Ferreira-Filho EX, Puls J, Coughlan MP (1993) Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *J Ind Microbiol* 11:171–180 . doi: 10.1007/BF01583719
- Florencio C, Colli A, Farinas S (2017) Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Quim Nova* 40:1082–1093 . doi: 10.21577/0100-4042.20170104
- Frazzetto G (2003) White biotechnology. *Sci Soc* 4:835–837 . doi: 10.1038/sj.embor.embor928
- Freiesleben P V, Spodsberg N, Blicher TH, Anderson L, Jorgensen H, Stalbrand H, Meyer AS, Krogh KBRM (2016) An *Aspergillus nidulans* GH26 endo- β -mannanase with a novel degradation pattern on highly substituted galactomannans. *Enzyme Microb Technol* 83:68–77
- Fry SC (2017) Plant Cell Wall Polymers. In: Love J, Bryant JA (eds) *Biofuels and bioenergy*, 1st edn. John Wiley & Sons, pp 59–87
- Gomes HAR, Moreira LRS, Júnior ACS, Fontes W, Santana RH, Kruger RH, Valle de Sousa M, Ricart CAO, Ferreira-Filho EX (2020) Evaluation of different secretomes produced by *Clonostachys byssicola* as tools to holocellulose breakdown. *Int Biodeterior Biodegrad* 148:104880 . doi: 10.1016/j.ibiod.2019.104880
- Gu X, Lu H, Chen W, Meng X (2021a) Characterization of a novel thermophilic mannanase and synergistic hydrolysis of galactomannan combined with swollenin. *Catalysts* 11:1–11 . doi: 10.3390/catal11020254
- Gu X, Lu H, Zhang L, Meng X (2021b) A Thermophilic GH5 Endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and Its synergistic hydrolysis of mannan-containing polysaccharides. *Catalysts* 11:2–13 . doi: 10.3390/catal11070862
- Gummadi SN, Panda T (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases * a re v iew. *Process Biochem* 38:987–996
- Guruprasad K, Reddy BVB, Pandit MW (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng Des Sel* 4:155–161 . doi: 10.1093/protein/4.2.155

- Hilge M, Gloor S, Winterhalter K, Zimmermann W, Piontek K (1996) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of two β -mannanase isoforms from *Thermomonospora fasca* KW3. *Acta Crystallogr* 52:1224–1225 . doi: 10.1107/S0907444996009006
- Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007) Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* (80-) 315:804–807 . doi: 10.1126/science.1137016
- Huang, Yao-Bing fu Y (2013) Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chem* 15:1095–1111 . doi: 10.1039/c3gc40136g
- Jana UK, Suryawanshi RK, Prajapati BP, Soni H, Kango N (2018) Production optimization and characterization of manno oligosaccharide generating B-mannanase from *Aspergillus oryzae*. *Bioresour Technol* 268:308–314 . doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.143
- Jaramillo PMD (2014) Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo. Universidade de Brasília
- Johnson LA, White PJ, Galloway R (2008) Soybeans: chemistry, production, processing and utilization, 1st edn. AOCS Press
- Jong E de, Jungmeier G (2015) Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In: Pandey A, Höfer R, Taherzadeh M, Nampoothiri KM, Larroche C (eds) *Industrial biorefineries & white biotechnology*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, p 710
- Kamm B, Kamm M (2004) Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:137–145 . doi: 10.1007/s00253-003-1537-7
- Karahalil E, Germec M, Karaoglan M, Yatmaz E, Coban HB, Inan M, Turhan I (2020) Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. *Biomass Convers Biorefinery* 10:1189–1205 . doi: 10.1007/s13399-019-00487-1
- Karlsson M, Amby DB, Lackner G, Lagopodi AL, Wang J, Kosawang C, Durling MB, Henrissat B, Choi J, Levasseur A, Vannacci G, Kamou N, Panteris E, Tzelepis GD, Zapparata A, Sarrocco S, Nygren K, Collinge DB, Dubey MK, Jensen B, Lee Y-H,

- Jensen DF, Hoffmeister D, Pöggeler S (2015) Insights on the Evolution of Mycoparasitism from the Genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biol Evol* 7:465–480 . doi: 10.1093/gbe/evu292
- Karp SG, Rozhkova AM, Semenova M V., Osipov DO, de Pauli STZ, Sinitsyna OA, Zorov IN, de Souza Vandenberghe LP, Soccol CR, Sinitsyn AP (2021) Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. *Bioresour Technol* 330:124888 . doi: 10.1016/j.biortech.2021.124888
- Kim D (2018) Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose : Inhibitor Effects and Detoxification Strategies : A Mini Review. *Molecules* 23:2–21 . doi: 10.3390/molecules23020309
- Kou Q, Xun L, Liu X (2016) TopPIC: A software tool for top-down mass spectrometry-based proteoform identification and characterization. *Bioinformatics* 32:3495–3497 . doi: 10.1093/bioinformatics/btw398
- Kubicek CP (2013) The plant biomass. In: Kubicek CP (ed) *Fungi and Lignocellulosic Biomass*, 1st edn. Joh Wiley & Sons, Iowa, pp 1–11
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685 . doi: 10.1038/227680a0
- Lermyte F, Sobott F (2015) Electron transfer dissociation provides higher-order structural information of native and partially unfolded protein complexes. *Proteomics* 15:2813–2822 . doi: 10.1002/pmic.201400516
- Li M, Cao S, Meng X, Studer M, Wyman CE, Ragauskas AJ, Pu Y (2017a) The effect of liquid hot water pretreatment on the chemical-structural alteration and the reduced recalcitrance in poplar. *Biotechnol Biofuels* 10:1–13 . doi: 10.1186/s13068-017-0926-6
- Li M, Yoo CG, Pu Y, Biswal AK, Mohnen D, Ragauskas AJ, Tolbert AK (2019) Downregulation of pectin biosynthesis gene GAUT4 leads to reduced ferulate and lignin- carbohydrate cross-linking in switchgrass. *Commun Biol* 2:1–11 . doi: 10.1038/s42003-018-0265-6
- Li Q, Loman A Al, Coffman AM, Ju L-K (2017b) Soybean hull induced production of carbohydrases and protease among *Aspergillus* and their effectiveness in soy flour

- carbohydrate and protein separation. *J Biotechnol* 248:1–8
- Liao H, Li S, Zheng H, Wei Z, Liu D, Raza W, Shen Q (2014) A new acidophilic thermostable endo-1, 4- β -mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2 : cloning , characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* 14:1–12 . doi: 10.1186/s12896-014-0090-z
- Liu HM, Wang FY, Liu YL (2016) Hot-compressed water extraction of polysaccharides from soy hulls. *Food Chem* 202:104–109 . doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.129
- Liu Y, Lei F, He L, Xu W, Jiang J (2020a) Comparative study on the monosaccharides of three typical galactomannans hydrolyzed by different methods. *Ind Crops Prod* 157: . doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112895
- Liu Z, Ning C, Yuan M, Fu X, Yang S, Wei X, Xiao M, Mou H, Zhu C (2020b) High-efficiency expression of a superior β -mannanase engineered by cooperative substitution method in *Pichia pastoris* and its application in preparation of prebiotic manooligosaccharides. *Bioresour Technol* 311:123482 . doi: 10.1016/j.biortech.2020.123482
- Liu Z, Ning C, Yuan M, Yang S, Wei X, Xiao M, Fu X, Zhu C, Mou H (2020c) High-level expression of a thermophilic and acidophilic β -mannanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with significant potential in manooligosaccharide preparation. *Bioresour Technol* 295:122257 . doi: 10.1016/j.biortech.2019.122257
- Lu H, Luo H, Shi P, Huang H (2014) A novel thermophilic endo- β -1, 4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3 : functional roles of carbohydrate-binding module and Thr / Ser-rich linker region. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2155–2163 . doi: 10.1007/s00253-013-5112-6
- Lu H, Luo H, Shi P, Huang H, Meng K, Yan P, Yao B (2013) A novel thermophilic endo- β -1, 4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3 : functional roles of carbohydrate-binding module and Thr / Ser-rich linker region. *Biotechnol Relev Enzym Proteins* 98:2155–2163 . doi: 10.1007/s00253-013-5112-6
- Luo H, Wang Y, Wang H, Yang J, Yang Y, Huang H, Yang P, Bai Y, Shi P, Fan Y, Yao B (2009) A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: Gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:453–461 . doi: 10.1007/s00253-008-1766-x

- Ma L, Jiang H, Li W, Qin H, Lv Z, Huang J, Hou X, Wang W (2021) Biochemical properties of a native β -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus* QH1 and partial characterization of its N-glycosylation. *Biochem Biophys Reports* 26:100922 . doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100922
- Macgregor EA (2005) An overview of clan GH-H and distantly-related families. *Biologia (Bratisl)* 16:5–12
- Mäkelä MR, Aguilar-Pontes MV, Van Rossen-Uffink D, Peng M, De Vries RP (2018) The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA. *Sci Rep* 8:1–8 . doi: 10.1038/s41598-018-25152-x
- Mäkelä MR, Bouzid O, Robl D, Post H, Peng M, Heck A, Altelaar M, de Vries RP (2017) Cultivation of *Podospora anserina* on soybean hulls results in efficient enzyme cocktail for plant biomass hydrolysis. *N Biotechnol* 37:1–10
- Mäkelä MR, Donofrio N, Vries RP De (2014) Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genet Biol* 72:2–9 . doi: 10.1016/j.fgb.2014.08.010
- Malgas S, Thoresen M, van Dyk JS, Pletschke BI (2017) Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb Technol* 103:1–11 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.04.007
- Marco JI da C, Souza-Neto GP, Castro CFS, Michelin M, Polizeli MDLTM, Ferreira-Filho EX (2015) Partial Purification and Characterization of a Thermostable β -Mannanase from *Aspergillus foetidus*. *Appl Sci* 5:881–893 . doi: 10.3390/app5040881
- Mielenz JR, Bardsley JS, Wyman CE (2009) Bioresource Technology Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour Technol* 100:3532–3539 . doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.044
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428
- Mistry V V, Maubois J (2017) Application of Membrane Separation Technology to Cheese Production. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett D w (eds) *Cheese*, 4th edn. Elsevier Ltd, pp 677–697
- Montibeller VW (2015) Mananase: produção por via convencional e recombinante e

- obtenção de produto formulado líquido. Universidade Federal do Paraná
- Moreira GM (2016) DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Clonostachys* NO BRASIL LAVRAS - MG. Universidade Federal de Lavras
- Moreira GM, Abreu LM, Carvalho VG, Schroers HJ, Pfenning LH (2016) Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycol Prog* 15:1031–1039 . doi: 10.1007/s11557-016-1224-6
- Moreira LRS, Filho EXF (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:165–178 . doi: 10.1007/s00253-008-1423-4
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012a) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: Show K-Y, Guo X (eds) *Industrial Waste*, 1st edn. InTech, Rijeka, p 274
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012b) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: *Industrial waste*. pp 121–140
- Nadaroglu H, Dikbas N (2018) Purification and Characterization of Linamarase from *Lactobacillus Plantarum*. *J Bacteriol Mycol* 4:1–6 . doi: 10.26420/jbacteriolmycol.2017.1045
- Nevalainen H, Peterson R (2014) Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much ? *Front Microbiol* 5:1–10 . doi: 10.3389/fmicb.2014.00075
- Obembe OO, Jacobsen E, Visser RGF, Vincken J-P (2006) Cellulose-hemicellulose networks as target for in planta modification of the properties of natural fibres. *Biotechnol Mol Biol Rev* 1:76–86
- Ochoa-villarreal M, Aispuro-hernández E, Vargas-Arispu I, Martínez-Téllez MÁ (2012) Plant Cell Wall Polymers : Function , Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In: Gomes A de S (ed) *Polymerization*, 1st edn. Intechopen
- Ostergaad LH, Olsen HS (2011) Industrial Applications of Fungal Enzymes. In: Hofrichter M (ed) *Industrial applicatioons*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg, pp 269–290
- Pauly M, Gille S, Liu L, Mansoori N, de Souza A, Schultink A, Xiong G (2013)

- Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238:627–642 . doi: 10.1007/s00425-013-1921-1
- Pauly M, Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J* 54:559–568 . doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x
- Penido A, Mendes P, Campos I, Mendes L (2020) *Malaysian Journal of Microbiology*. *Malays J Microbiol* 16:396–406 . doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose , hemicellulose and lignin : an overview. *Int Microbiol* 5:53–63 . doi: 10.1007/s10123-002-0062-3
- Pinto ASB (2019) Efeito gastroprotetor da gom guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e galactomanana da fava danta (*dimorphandra gardneriana*) na gastrite experimental induzida por álcool. Universidade do Ceará
- Polleto P (2015) Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo. Unversidade e Caxias do Sul
- Ponnuasamy VK, Nguyen DD, Dharmaraja J, Shobana S, Banu JR, Saratale RG, Chang SW, Kumar G (2019) A review on lignon structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour Te* 271:462–472 . doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.070
- Popper ZA (2008) Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* 11:286–292 . doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.012
- Purchart V, Vrsanská M, Svoboda P, Pohl J, Ögel ZB, Biely P (2004) Purification and characterization of two forms of endo- h -1 , 4-mannanase from a thermotolerant fungus , *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochim Biophys Acta* 1674:239–250 . doi: 10.1016/j.bbagen.2004.06.022
- Qin L, Li WC, Liu L, Zhu JQ, Li X, Li BZ, Yuan YJ (2016) Inhibition of lignin - derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnol Biofuels* 9:1–10 . doi: 10.1186/s13068-016-0485-2
- Reiter W-D (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 5:536–542 . doi: 10.1016/S1369-5266(02)00306-0
- Robles Barros PJ, Ramirez Ascheri DP, Siqueira Santos ML, Morais CC, Ramirez

- Ascheri JL, Signini R, dos Santos DM, de Campos AJ, Alessandro Devilla I (2020) Soybean hulls: Optimization of the pulping and bleaching processes and carboxymethyl cellulose synthesis. *Int J Biol Macromol* 144:208–218 . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.074
- Rocha hELDER A, Silva AJ, Gómez-mendoza DP, Santos Junior ACM, Cologna NM, Almeida RoM, Sousa M v, Ricart CAO, Ferreira-Filho EX (2017) Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. *J Biotechnol* 254:51–58 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.001
- Rodrigues SLc, Moreira RLDS, Cardoso MH, Merçon F (2003) AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ULTRAFILTRAÇÃO DE SUCO DE BANANA 1. *Food Sci Technol* 23:98–101
- Rodríguez MM (2016) Lignin biomass conversion into chemicals and fuels. Technical University of Denmark
- Rojas MJ (2012) Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja. Universidade Federal de São Carlos
- Roy MD, Peterson ME, Danson MJ, Price NC, Kelly SM, Monk CR, Weinberg CS, Oudshoorn ML, Lee CK (2010) The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochemistry* 425:353–360 . doi: 10.1042/BJ20091254
- Sadh PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour Bioprocess* 5:1–15 . doi: 10.1186/s40643-017-0187-z
- Sakai K, Mochizuki M, Yamada M, Shinzawa Y, Minezawa M, Kimoto S, Murata S, Kaneko Y, Ishihara S, Jindou S, Kobayashi T, Kato M, Shimizu M (2017) Biochemical characterization of thermostable β -1,4-mannanase belonging to the glycoside hydrolase family 134 from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:3237–3245 . doi: 10.1007/s00253-017-8107-x
- Saraiva RM, M PEF De, Borges ÁV (2014) USO E PERSPECTIVA DE *Clonostachys rosea* COMO AGENTE DE BIOCONTROLE USE AND PROSPECT OF *Clonostachys rosea* as A BIOCONTROL AGENT. *Rev Ciências Agrícolas* 31:78–91

- Schroers AH, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W, Samuels J, Seifert KA (1999) Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other fungi. *Mycologia* 91:365–385
- Schroers H (2001) A monograph of *Bionectria* and its *Clonostachys* anamorphs. Centraalbureau voor Schimmelcultuur
- Sciuto DL (2017) Cellulose-degrading enzyme production by *Clonostachys byssicola*: Partial purification and characterization of an endoglucanase. *Mycosphere* 8:415–431 . doi: 10.5943/mycosphere/8/3/4
- Sciuto D Lo (2015) Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase. Universidade de Brasília
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219–228 . doi: 10.1016/S1369-5274(03)00056-0
- Sharma M, Sangwan RS, Khatkar BS, Singh SP (2021) Development of a Prebiotic Oligosaccharide Rich Functional Beverage from Sweet Sorghum Stalk Biomass. *Waste and Biomass Valorization* 12:2001–2012 . doi: 10.1007/s12649-020-01156-5
- Sharma S, Vaid S, Bhat B, Singh S, Bajaj BK (2019) Thermostable enzymes for industrial biotechnology. In: Singh RS, Singhanian RR, Pandey A, Larroche C (eds) *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier B.V., pp 469–495
- Sheng Y, Lam SS, Wu Y, Ge S, Wu J, Cai L, Huang Z, Le Q Van, Sonne C, Xia C (2021) Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresour Technol* 324: . doi: 10.1016/j.biortech.2020.124631
- Shimizu M, Kaneko Y, Ishihara S, Mochizuki M, Sakai K, Yamada M, Murata S, Itoh E, Yamamoto T, Sugimura Y, Hirano T, Takaya N, Kobayashi T, Kato M (2015) Novel α -1,4-Mannanase Belonging to a New Glycoside Hydrolase Family in *Aspergillus nidulans* *. *J Biol Chem* 290:27914–27927 . doi: 10.1074/jbc.M115.661645
- Silva C de OG, Santos Júnior A de CM, Santana RH, Krüger RH, Fontes W, de Sousa

- MV, Ricart CAO, Ferreira Filho EX (2019) Mild hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse enhances the production of hemicellulases by *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:1517–1529 . doi: 10.1007/s10295-019-02207-0
- Silva CD, Kazama R, Faustino JO, Zambom A, Santos GT, Branco AF (2004) Digestibilidade in vitro e degradabilidade in situ da casca do grão de soja , resíduo de soja e casca de algodão. *Anim Sci* 26:501–506
- Silva COG, Ribeiro JA de A, Souto AL, Abdelnur PV, Batista LR, Rodrigues KA, Parachin NS, Filho EXF (2018) Sugarcane Bagasse Hydrothermal Pretreatment Liquors as Suitable Carbon Sources for Hemicellulase Production by *Aspergillus niger*. *Bioenergy Res* 11:316–329 . doi: 10.1007/s12155-018-9898-z
- Silva COG, Vaz RP, Ferreira-Filho EX (2017) Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 12:277–289 . doi: 10.1002/bbb.1832
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS (2011a) Cell wall polysaccharides from fern leaves: Evidence for a mannan-rich Type III cell wall in *Adiantum raddianum*. *Phytochemistry* 72:2352–2360 . doi: 10.1016/j.phytochem.2011.08.020
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MAS, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS (2011b) O revestimento das samambaias. São Paulo
- Sluiter A, Hames R, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Tepleton D, Crocker D (2008a) Determination of structural carbohydrates and Lignin in biomass. Tech Rep NREL
- Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D (2008b) Chirurgie des métastases pulmonaires des cancers colorectaux : facteurs prédictifs de survie. Tech Rep NREL 0:0
- Soni H, Kumar H, Brett R, Naveen IP (2016) Purification and characterization of β -mannanase from *Aspergillus terreus* and its applicability in depolymerization of mannans and saccharification of lignocellulosic biomass. *3 Biotech* 6:1–11 . doi: 10.1007/s13205-016-0454-2
- Soni H, Rawat HK, Ahirwar S, Kango N (2017) Screening , statistical optimized production , and application of β -mannanase from some newly isolated fungi. *Eng Life Sci* 17:392–401 . doi: 10.1002/elsc.201600136

- Souza WR, Maitan-alfenas, Gabriela P Gouvêa PF, Brown NA, Savoldi M, Battaglia E, Goldman MHS, de Vries RP, Goldman GH (2013) The influence of *Aspergillus niger* transcription factors AraR and XlnR in the gene expression during growth in D -xylose , L -arabinose and steam-exploded sugarcane bagasse. *Fungal Genet Biol* 60:29–45 . doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.007
- Srivastava PK, Kapoor M (2017) Production , properties , and applications of endo - β -mannanases. *Biotechnol Adv* 35:1–19 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.001
- Sticklen MB (2008) Plant genetic engineering for biofuel production : towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* 9:433–443 . doi: 10.1038/nrg2336
- Tanimoto T, Ikuta A, Sugiyama M, Koizumi K (2002) HPLC analysis of manno-oligosaccharides derived from *Saccharomyces cerevisiae* mannan using an amino column or a graphitized carbon column. *Chem Pharm Bull* 50:280–283 . doi: 10.1248/cpb.50.280
- Tejirian A, Xu F (2010) Inhibition of Cellulase-Catalyzed Lignocellulosic Hydrolysis by Iron and Oxidative Metal Ions and Complexes \square . *Appl Environ Microbiol* 76:7673–7682 . doi: 10.1128/AEM.01376-10
- Thomas LH, Forsyth VT, Adriana Š, Kennedy CJ, May RP, Altaner CM, Apperley DC, Wess TJ, Jarvis MC (2013) Structure of Cellulose Micro fi brils in Primary Cell Walls. *Plant Physiol* 161:465–476 . doi: 10.1104/pp.112.206359
- Tian Y, Jiang Y, Ou S (2013) Interaction of cellulase with three phenolic acids. *Food Chem* 138:1022–1027 . doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.129
- Toro-trochez JL, Carrillo-pedraza ES, Bustos-Martínes D, García-mateos FJ, Ruiz-Rosas RR, Rodríguez-Mirasol J, Cordero T (2019) Thermogravimetric characterization and pyrolysis of soybean hulls. *Bioresour Technol Reports* 6:183–189 . doi: 10.1016/j.biteb.2019.02.009
- Uechi K, Watanabe M, Fujii T, Kamachi S, Inoue H (2020) Identification and Biochemical Characterization of Major β -Mannanase in *Talaromyces cellulolyticus* Mannanolytic System. *Appl Biochem Biotechnol* 192:616–631 . doi: 10.1007/s12010-020-03350-6
- Uenojo M, Pastore M (2007) Revisão. *Quim Nova* 30:388–394
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin Biosynthesis

- and Structure 1. *Plant Physiol* 153:895–905 . doi: 10.1104/pp.110.155119
- Vasconcellos VM, Tardioli PW, Giordano RLC, Farinas CS (2016) Addition of metal ions to (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *N Biotechnol* 33:331–337
- Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, Beldman G, Visser RGF, Voragen AGJ (2003) Pectin the hairy thing. In: Voragen F, Schols H, Visser R (eds) *Advances in Pectin and Pectinase Research*, 1st edn. Springer, Dordrecht, pp 47–61
- Visser EM, Falkoski DL, de Almeida MN, Maitan-Alfenas GP, Guimarães VM (2013) Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 144:587–594 . doi: 10.1016/j.biortech.2013.07.015
- Voragen AGJ, Coenen G-J, Verhoef RP, Schols HA (2009) Pectin , a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem* 20:263–275 . doi: 10.1007/s11224-009-9442-z
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol Adv* 23:115–129 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.11.001
- Wang NN, Liu J, Li YX, Ma JW, Yan QJ, Jiang ZQ (2021) High-level expression of a glycoside hydrolase family 26 β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for production of partially hydrolysed fenugreek gum. *Process Biochem* 100:90–97 . doi: 10.1016/j.procbio.2020.09.034
- Wessel D, Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141–143 . doi: 10.1016/0003-2697(84)90782-6
- Whistler RL (2012) Hemicelluloses. In: *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives: Third Edition*. pp 295–308
- Wingfield MJ, Beer ZWDE, Slippers B, Wingfield BD, Groenewald JZ, Lombard L, Crous PW (2012) One fungus , one name promotes progressive plant pathology. One fungus, one name Promot Progress plant Pathol 13:604–613 . doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00768.X

- Xie J, Pan L, He Z, Liu W, Zheng D, Zhang Z, Wang B (2020) A novel thermophilic β -mannanase with broad-range pH stability from *Lichtheimia ramosa* and its synergistic effect with α -galactosidase on hydrolyzing palm kernel meal. *Process Biochem* 88:51–59 . doi: 10.1016/j.procbio.2019.09.029
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2010) Enzyme and Microbial Technology Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol* 46:170–176 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.11.001
- Ximenes EA, Chen H, Kataeva IA, Cotta MA, Felix CR, Ljungdahl LG, Li X (2005) A mannanase , ManA , of the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* sp . strain PC-2 has carbohydrate binding and docking modules. *J Microbiol* 51:559–568 . doi: 10.1139/W05-033
- Xin D, Ge X, Sun Z, Viikari L, Zhang J (2015) Competitive inhibition of cellobiohydrolase I by manno-oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* 68:62–68 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.09.009
- Yang H, Shi P, Lu H, Wang H, Luo H, Huoqing H, Yang P (2015) A thermophilic β -mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 with broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers. *Food Chem* 173:283–289
- York WS, Darvill AG, McNeil M, Stevenson TT, Albersheim P (1986) Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol* 118:3–40 . doi: 10.1016/0076-6879(86)18062-1
- Yu S, Li Z, Wang Y, Chen W, Fu L, Tang W, Chen C (2015) High-level expression and characterization of a thermophilic β -mannanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 37:1853–1859 . doi: 10.1007/s10529-015-1848-7
- Zhang J, Zhou H, Liu D, Zhao X (2019) Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose, 1st edn. Academic Press