



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



CLEIDINEIA SOUZA DE SANTANA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
ENDOGLUCANASE RECOMBINANTE DE *Moniliophthora*
perniciosa (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA A PARTIR
DE CÉLULAS DE *Escherichia coli***

CLEIDINEIA SOUZA DE SANTANA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
ENDOGLUCANASE RECOMBINANTE DE *Moniliophthora*
perniciosa (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA A PARTIR
DE CÉLULAS DE *Escherichia coli***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia, da Universidade Estadual
de Feira de Santana, como requisito para
obtenção do título de doutora.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Guimarães
Benevides

Coorientadores: Prof. Dr. Carlos Priminho
Pirovani e Prof. Dr. Humberto Fonseca de
Freitas

Feira de Santana
2025

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

S223p

Santana, Cleidineia Souza de

Produção e caracterização bioquímica de uma endoglucanase recombinante de *Moniliophthora perniciosa* (STAHÉL) Aime & Phillips-Mora a partir de células de *Escherichia coli* / Cleidineia Souza de Santana. – 2025. 102 f.: il.

Orientadora: Raquel Guimarães Benevides

Coorientador: Carlos Priminho Pirovani e Humberto Fonseca de Freitas
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2025.

1. Celulase. 2. Hidrólise de biomassa. 3. Fungos filamentosos. 4. Resíduos agroindustriais. I. Benevides, Raquel Guimarães, orient. II. Pirovani, Carlos Priminho, coorient. III. Freitas, Humberto Fonseca de, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

CDU 582.28

Daniela Machado Sampaio Costa - Bibliotecária - CRB-5/2077

CLEIDINEIA SOUZA DE SANTANA

**“PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
ENDOGLUCANASE RECOMBINANTE DE *Moniliophthora perniciosa*
(STAHÉL) AIME & PHILLIPS-MORA A PARTIR DE CÉLULAS DE
Escherichia coli”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 20 de maio de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL GUIMARAES BENEVIDES**
Data: 22/05/2025 10:50:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Prof^a. Dr^a. **Raquel Guimarães Benevides**

UFC

Documento assinado digitalmente
 **ROGERIO MERCES FERREIRA SANTOS**
Data: 21/05/2025 16:06:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Rogério Mercês Ferreira Santos**

UEFS

Documento assinado digitalmente
 **ARIANA SILVA SANTOS**
Data: 21/05/2025 09:00:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof^a. Dr^a. **Ariana Silva Santos**

UNIVASF

Documento assinado digitalmente
 **GEISE CAMILA DE ARAUJO RIBEIRO**
Data: 21/05/2025 13:59:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof^a. Dr^a. **Geise Camila de Araujo Ribeiro**

SENAI CIMATEC

Documento assinado digitalmente
 **RENATA PINHEIRO CHAVES**
Data: 22/05/2025 11:13:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof^a. Dr^a. **Renata Pinheiro Chaves**

UFC

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, minha fonte de força diária, por me guiar até este momento.

À minha família, meu pilar emocional, expresso minha gratidão. Aos meus pais, Arnor e Jacira, que são responsáveis por grande parte do que sou hoje e por chegar até aqui. Aos meus irmãos, Ida, Sandra, Zé e Peta, por todo apoio, palavras de incentivo e companheirismo, fundamentais para essa trajetória.

Gostaria de expressar minha gratidão de forma especial à Professora Doutora Raquel Guimarães Benevides, pela orientação, paciência confiança, incentivo e por compartilhar seu vasto conhecimento. Tenho profunda admiração e respeito.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), meu sincero agradecimento pelo suporte contínuo. Agradeço especialmente a Goh pelo cuidado dedicado, pelas conversas enriquecedoras, pelas risadas compartilhadas e pela ajuda de sempre no preparo de materiais. A Paloma e Thai, pela amizade, pelos momentos de descontração, trocas, conselhos e por sempre estarem disponível quando precisei. A Alice, pelo suporte, parceria, ajuda e disponibilidade. À Jane, pela amizade construída ao longo desse tempo. Agradeço por compartilhar experiências, por ser uma companheira fiel nos momentos de desespero e de alegria, e por enfrentarmos juntas os desafios da vida acadêmica.

Ao professor Carlos Priminho Pirovani e o seu grupo de pesquisa, pelo acolhimento, apoio e suporte no CBG-UESC.

Ao professor Dr. Humberto Freitas, pela coorientação, apoio e direcionamento, paciência e suporte para o desenvolvimento desse trabalho, sobretudo nas etapas finais. À professora Sandra de Assis, pela disponibilidade, apoio e pela colaboração.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para esta conquista, os meus mais sinceros agradecimentos.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), agradeço pela oportunidade concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

RESUMO

As celulasas são enzimas hidrolíticas fundamentais para a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis, atuando na clivagem das ligações β -1,4-glicosídicas da celulose, componente estrutural predominante da parede celular vegetal. Produzidas naturalmente por diversos microrganismos, os fungos filamentosos destacam-se como os principais produtores, em virtude de sua alta eficiência enzimática e secreção extracelular. Entre esses, *Moniliophthora perniciosa*, um basidiomiceto patogênico causador da vassoura-de-bruxa no cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), secreta celulasas termoestáveis como parte de sua estratégia infecciosa, sendo uma fonte ainda inexplorada para aplicações biotecnológicas. Este estudo teve como objetivo, além de revisar os avanços recentes na produção recombinante de celulasas fúngicas, descrever pela primeira vez a produção, purificação e caracterização funcional da endoglucanase EG45 de *M. perniciosa*, expressa heterologicamente em *Escherichia coli*. A revisão de literatura evidenciou que diversos estudos relatam a expressão bem-sucedida de genes celulolíticos de fungos filamentosos em sistemas heterólogos, especialmente em *E. coli*, devido à sua fácil manipulação genética, rápido crescimento, elevada densidade celular e ampla disponibilidade de vetores de expressão. Essas tecnologias têm viabilizado a produção em larga escala de coquetéis enzimáticos otimizados, com ganhos significativos em rendimento, estabilidade e redução de custos, sobretudo para aplicações em biorrefinarias. Na parte experimental, o gene EG45, com códons otimizados, foi clonado nos vetores pET28a e pET32a, sendo obtida expressão eficiente com o vetor pET32a na cepa *E. coli* Rosetta (DE3), induzida com IPTG (1 mM) a 37 °C por 4 horas. Uma banda de aproximadamente 38 kDa, compatível com o peso molecular previsto, foi detectada por SDS-PAGE em ambas as frações solúvel e insolúvel. A purificação da fração insolúvel com solubilização em ureia e *refolding* resultou em alta pureza, mas com concentração insuficiente para testes de atividade enzimática. Em contrapartida, a proteína obtida da fração solúvel apresentou rendimento satisfatório e permitiu os ensaios funcionais, revelando atividade ótima a 50 °C e pH 6,0. Conclui-se que a produção recombinante da endoglucanase EG45 de *Moniliophthora perniciosa*, aqui descrita pela primeira vez, representa um avanço importante tanto para a compreensão da biologia desse fitopatógeno quanto para seu potencial uso industrial. A demonstração da atividade funcional da enzima reforça a viabilidade da expressão heteróloga em *E. coli* como hospedeiro eficiente para a produção de enzimas fúngicas ativas, com aplicações promissoras na valorização de resíduos agroindustriais e no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: Expressão heteróloga, celulasas, fungos fitopatogênicos, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Cellulases are hydrolytic enzymes that play a crucial role in the degradation of plant cell walls by cleaving β -1,4-glycosidic bonds in cellulose, making them essential for converting lignocellulosic biomass into fermentable sugars. Among the various microorganisms capable of producing cellulases, filamentous fungi stand out due to their high enzymatic capacity and extracellular secretion. One such fungus is *Moniliophthora perniciosa*, a basidiomycete phytopathogen responsible for witches' broom disease in cacao (*Theobroma cacao* L.), which employs thermostable cellulases as part of its infection strategy. Despite its biological relevance, recombinant production of enzymes from this fungus remains underexplored. This study aimed to both review recent advances in the recombinant production of fungal cellulases and to report, for the first time, the heterologous expression, purification, and functional characterization of the endoglucanase EG45 from *M. perniciosa* in *Escherichia coli*. The literature review highlights multiple successful cases of expressing cellulolytic genes from filamentous fungi in heterologous systems, particularly *E. coli*, due to its advantages including ease of genetic manipulation, fast growth rate, high cell density, and a wide range of expression vectors. Recombinant DNA technology has enabled large-scale production of optimized enzymatic cocktails with significant gains in yield, stability, and cost-effectiveness, especially for biorefinery applications. Experimentally, the EG45 gene with codon optimization was cloned into both pET28a and pET32a vectors. The expression of the fusion protein pET32a-EG45 was achieved in *E. coli* Rosetta (DE3), following induction with IPTG (1 mM) at 37 °C for 4 hours. A protein band of approximately 38 kDa, matching the predicted molecular weight, was detected by SDS-PAGE in both soluble and insoluble fractions. Purification from the insoluble fraction using urea solubilization and refolding yielded high purity but insufficient concentration for enzymatic assays. In contrast, purification from the soluble fraction provided a functional enzyme in adequate quantity and quality. The recombinant enzyme exhibited optimal activity at 50 °C and pH 6.0, demonstrating thermal stability and industrially relevant functionality. In conclusion, the successful recombinant production of EG45 from *Moniliophthora perniciosa*, reported here for the first time, represents a significant advancement in understanding the biology of this phytopathogen and exploring its biotechnological potential. The proven activity of the enzyme supports the feasibility of using *E. coli* as a heterologous host for the efficient production of active fungal enzymes, with promising applications in agro-industrial waste valorization and sustainable biofuel production.

Keywords: Heterologous expression, cellulase, phytopathogenic fungi, agro-industrial residues.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS	19
2 OBJETIVO GERAL	22
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO I – PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE CELULASES FÚNGICAS PARA A HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA – UMA REVISÃO	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE CELULASES	26
3 <i>Moniliophthora perniciosa</i> : FITOPATÓGENO PRODUTOR DE CELULASES AINDA POUCO EXPLORADAS	28
4 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	31
5 CELULOSE E CELULASES	33
6 ENDOGLUCANASE	37
7 EXOGLUCANASE/CELOBIOHIDROLASE	38
8 β -GLICOSIDASE	39
9 PRODUÇÃO DE CELULASES RECOMBINANTES	40
10 EXPRESSÃO DE CELULASES EM <i>Escherichia coli</i>	41
11 CEPAS DE <i>E. coli</i> UTILIZADAS COMO HOSPEDEIROS	42
12 VETORES DE CLONAGEM - pET32a e pET28a	43
13 VANTAGENS DAS CELULASES RECOMBINANTES NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	45
14 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	50
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA ENDOGLUCANASE 45 (EG45)	71
2.1.2 Obtenção do plasmídeo recombinante	71
2.1.3 Transformação	72
2.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENDOGLUCANASE 45 - rGH45	73

2.2.1 Expressão em pequena escala e verificação da solubilidade – ensaios preliminares	73
2.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	74
2.2.3 Expressão da proteína recombinante em larga escala	75
2.2.4 Purificação da proteína EG45 recombinante	75
2.2.5 Purificação da fração insolúvel	76
2.2.6 Avaliação das condições de expressão solúvel da proteína recombinante - pET32a-GH45	77
2.2.8 Ensaios de atividade da rGH45	79
2.2.8.1 Determinação da atividade da proteína purificada	79
2.2.8.2 Determinação do teor de proteína total	79
2.2.8.3 Otimização de pH e temperatura ótimos	80
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR rGH45	80
3.1.1 Análise <i>in silico</i> aponta endoglucanase 45 (EG45) de <i>M. perniciosus</i> como potencial celulase	80
3.1.2 Identificação e seleção das colônias transformadas	82
3.2 EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA: PRIMEIRAS EVIDÊNCIAS DE SOLUBILIDADE	83
3.2.2 Purificação por cromatografia de afinidade da rGH45 (pET-32a-EG45) na fração insolúvel expressa em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	86
3.2.3 Análise da concentração de proteína total na fração insolúvel e teste funcional de atividade	88
3.2.4 Expressão da proteína recombinante rGH45 na fração solúvel sob condições otimizadas	89
3.2.5 Produção em larga escala e purificação da rGH45 solúvel	91
3.2.6 Determinação dos parâmetros ótimos de atividade da proteína solúvel: efeitos do pH e da temperatura	92
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i> , agente causador da doença vassoura-de-bruxa.....	29
Figura 2: Representação dos principais componentes da biomassa lignocelulósica.	31
Figura 3: Aplicações Industriais Especializadas da Biomassa Lignocelulósica.	32
Figura 4: Estrutura da celulose apresentando os monômeros de glicose ligados por ligações glicosídicas do tipo β -1,4.	34
Figura 5: Estrutura tridimensional das celulasas típicas, disponível no banco de dados Protein Data Bank (PDB). 1: Estrutura tridimensional de uma endoglucanase de <i>Humicola insolens</i> PDB 2ENG; 2: Estrutura tridimensional de uma celobiohidrolase de <i>Trichoderma harzianum</i> PDB 2Y9N; 3: Estrutura tridimensional de uma β -glicosidase de <i>Listeria innocua</i> PDB 4ZOA.	35
Figura 6: Representação do mecanismo de ação das enzimas celulolíticas e das LPMOs na fibra celulósica.	36
Figura 9: Transformação de pET28a-EG45 em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)(A); pET-32a-EG45 em <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) (B), e pET-32a-EG45 em <i>E. coli</i> BL21 (PLysS) (C) com crescimento positivo.....	82
Figura 10: Expressão da endoglucanase 45 em vetor pET28a (pET28a-EG45) utilizando células de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) após indução a 37 °C por 4 horas com adição de 0,4mM IPTG. Gel SDS-PAGE14%; M: marcador de peso molecular para proteína de 14 a 97 kDa; ET: Extrato total; (-): sem IPTG; (+): com IPTG; FS: Fração solúvel; FI: Fração insolúvel.	83
Figura 11: Expressão da endoglucanase 45 em vetor pET32a (pET32a- EG45) utilizando células de <i>E. coli</i> BL21 (PLysS) em vermelho; e em pET32a (pET32a- EG45) utilizando células de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) em azul, após indução a 37 °C por 4 horas com adição de IPTG. Gel SDS-PAGE14%; M: Marcador de peso molecular para proteína de 14 a 97 kDa; ET: Extrato total; (-): sem IPTG; (+): com IPTG; FS: Fração solúvel; FI: Fração insolúvel.	84
Figura 12: Purificação da proteína recombinante a partir da fração solúvel em vetor pET32a (pET32a-EG45) utilizando células de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. SDS PAGE 14%; M: Marcador de peso molecular de proteína de 14 a 97 kDa; ET: Extrato total; FNI: Fração não interagida; 50 a 500: Amostras eluídas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mM.....	86
Figura 13: Purificação da proteína recombinante a partir da fração insolúvel em vetor pET32a (pET32a-EG45) utilizando células de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3), por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. SDS PAGE 14 %; M: Marcador de peso molécula de proteína em de 14 a 97 kDa; ET: Extrato total; FNI: Fração não interagida; 50 a	

500: amostras eluídas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mM.88

Figura 14: Expressão da endoglucanase 45 em vetor pET32a (pET32a- EG45) utilizando células de *E. coli* Rosetta (DE3) em azul, após indução a 37 °C por 4 horas com variação da concentração de IPTG. Gel SDS-PAGE14%; M: Marcador de peso molecular para proteína de 14 a 97 kDa; **Concentração de IPTG:** 0 mM; 0,1 mM; 0,5 mM; 1,0 mM.....90

Figura 15: Purificação da proteína recombinante a partir da fração solúvel em vetor pET32a (pET32a-EG45) utilizando células de *E. coli* Rosetta (DE3) por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. SDS-PAGE 14%; M: Marcador de peso molecular de proteína de 10 a 180 kDa; **FNI:** Fração não interagida; **50 a 250:** Amostras eluídas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mM; **250 []:** proteína purificada concentrada.92

Figura 16: Gráfico de Superfície (A) e Gráfico de área (B) obtidos a partir da aplicação do planejamento experimental Doehlert, na otimização do pH e temperatura de celulase de *M. perniciosus*.94

Figura 17: Gráfico de Pareto (A) e Gráfico de resíduos (B) obtidos a partir da aplicação do planejamento experimental Doehlert, na otimização do pH e temperatura de celulase de *M. perniciosus*.95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Revisão da utilização de fungos filamentosos para produção de celulases por fermentação submersa (FS) e por fermentação em estado sólido (FES)	27
Tabela 2: Celulases produzidas por fungos filamentosos e suas aplicações.	36
Tabela 3: Celulases recombinantes de origem microbiana utilizando <i>E. coli</i> como sistema hospedeiro.	41
Tabela 4: Concentrações de IPTG, intervalo de tempo e temperaturas utilizadas para o teste de expressão na forma solúvel para a construção pET32a-EG45 - Rosetta (DE3)	77
Tabela 5: Planejamento experimental Doehlert utilizado para otimizar as condições ideais de pH e temperatura da endoglucanase recombinante do fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i> .	80
Tabela 6: Planejamento Doehlert aplicado na determinação das condições ótimas de pH e temperatura da endoglucanase recombinante de <i>M. perniciosa</i> e resultados obtidos.	92
Tabela 7: Análise de Variância – ANOVA, obtida a partir dos resultados da aplicação do planejamento de Doehlert para otimização do pH e temperatura da celulase produzida por <i>M. perniciosa</i> .	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Construção pET28a-EG45	72
Quadro 2: Proteína de fusão pET32a-EG45	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	DNA complementar
CMC	Carboximetilcelulose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNS	Ácido-dinitrosalicílico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG45	Endoglucanase 45 de <i>Moniliophthora perniciosa</i>
IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactopiranosideo
kDa	KiloDaltons
LB	Luria Bertani
pI	Ponto isoelétrico
PM	Peso molecular
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-Dodecil-sulfato de sódio
UFC	Unidade formadora de colônia
μ L	Microlitros

1 INTRODUÇÃO GERAL

Com o esgotamento dos recursos de combustíveis fósseis em função do seu consumo ilimitado, a crescente poluição ambiental e, conseqüentemente, problemas graves relacionados à saúde, os interesses acadêmicos e industriais por fontes de energia alternativas promissoras para a produção de biocombustíveis e produtos químicos verdes estão aumentando (Oh; Jin, 2020).

Os problemas ambientais causados pelo uso indiscriminado de combustíveis fósseis podem ser parcialmente solucionados pela produção de biocombustíveis, como o bioetanol, produzidos a partir da biomassa lignocelulósica (Siqueira, 2020; Patel, 2020).

A produção de biocombustíveis a partir de biomassas lignocelulósicas (LCBs) é considerada uma alternativa viável e tem um potencial considerável para suceder a fonte de energia mais tradicionalmente utilizada, os combustíveis fósseis (Ashokkumar *Et Al.* 2022; Chen; Mu, 2019)

Os materiais lignocelulósicos são abundantes na Terra e a sua produção anual é em torno de 1,815 bilhão de toneladas. Resíduos agrícolas e resíduos florestais representam mais de 90% do material lignocelulósico no mundo. Esses materiais estão recebendo grande atenção como uma alternativa renovável e econômica aos recursos fósseis para a produção de vários produtos de valor agregado, a exemplo do biocombustível (Biag, 2020; Bhat, 2024).

Para maximizar a produção de bioetanol a partir de matéria-prima lignocelulósica, uma etapa de hidrólise enzimática da celulose em açúcares redutores deve ser realizada antes da fermentação (Barbosa *et al.* 2020).

A hidrólise enzimática é um processo desafiador para a produção de bioetanol, sendo uma etapa crucial devido a estrutura da celulose, a qual está organizada em fibrilas cristalinas que são estabilizadas por extensas ligações de hidrogênio. Na parede celular da planta, essas fibras são incorporadas em uma matriz de lignina hidrofóbica e hemiceluloses amorfas. Como resultado, a lignocelulose constitui uma estrutura recalcitrante que é altamente resistente à degrad

Para realizar a hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas são aplicadas enzimas celulolíticas ou celulasas.ação (Barbosa *et al.* 2020; Jensen *et al.* 2018).

Celulasas estão entre as três enzimas industriais mais relevantes devido à sua ampla gama de aplicações em diversos campos, como biocombustíveis, alimentos, ração animal, têxtil, indústria de papel e celulose, gestão de resíduos, indústria médica/farmacêutica, produção de protoplastos, engenharia genética, tratamento de poluição e indústrias químicas. Além disso, compartilha cerca de 20% do valor de mercado em todo o mundo como as enzimas industrialmente importantes (Srivastava *et al.* 2021).

Para sacarificação de biomassa lignocelulósica, as celulasas são predominantemente usadas na área de biocombustíveis (Ramamoorthy *et al.* 2019). Essas enzimas têm sido amplamente empregadas na produção de bioetanol a partir desse tipo de biomassa. Esse sistema enzimático é composto principalmente por três subcomponentes principais, a saber, endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21), que atuam sinergicamente para a conversão da celulose em glicose. As celulasas oferecem uma grande oportunidade de aproveitamento máximo da biomassa celulósica para a produção de açúcares de forma ecologicamente correta (Salomão *et al.* 2019; Srivastava *et al.* 2020).

Estudos recentes também têm demonstrado a ação das monooxigenases de polissacarídeos líticos (LPMOs), enzimas dependentes de cobre que clivam polissacarídeos por meio de um mecanismo oxidativo. Essas enzimas foram inicialmente usadas em sinergia com glicosídeos hidrolases para aumentar a sacarificação da biomassa vegetal e foram incorporadas em coquetéis enzimáticos comerciais de última geração para a produção de biocombustíveis. (Johansen, 2016; Moreau, *et al.* 2019).

Atualmente, essas enzimas estão sendo produzidas principalmente a partir de microrganismos, a exemplo de bactérias e fungos, no qual os fungos, principalmente os filamentosos, são preferidos devido a sua capacidade de penetração e versatilidade de utilização do substrato (Singh *et al.* 2021; Sukumaran, *et al.* 2021).

Os fungos filamentosos necessitam produzir e excretar várias enzimas hidrolases, a exemplo das celulases, as quais são responsáveis pela degradação da parede celular. Dentre os fungos produtores dessas enzimas, destaca-se o fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, causador da vassoura de bruxa, conhecido por produzir celulases termoestáveis, onde através da secreção dessas enzimas o fungo atravesse a parede celular da planta (Santana, 2010; De Santana, *et al.* 2023).

Nesse contexto, a utilização de enzimas provenientes de fungos fitopatogênicos representa um diferencial biotecnológico, especialmente devido à sua alta capacidade de degradar componentes da parede celular vegetal. Essa característica, intrinsecamente ligada à estratégia de infecção desses microrganismos, pode ser explorada em aplicações industriais, como o tratamento de resíduos agroindustriais.

Além dos microrganismos produtores de celulase, as enzimas celulases podem também ser obtidas pela utilização da tecnologia do DNA recombinante, utilizando hospedeiro bacteriano, essa técnica corresponde a uma promissora estratégia para reduzir os custos da produção de enzimas de interesse industrial, considerando que o sistema bacteriano alcança um alto crescimento em pouco tempo, produzindo uma maior quantidade de celulases comparado à produção pelos fungos. Além disso, permite a seleção de enzimas essenciais para a quebra eficiente de celulosas (Dadwal, *et al.* 2021; Javanmard, *et al.* 2021; Liu; Yu, 2012; Olempska-Beer, *et al.* 2006).

Há dados de uma gama de genes estruturais que codificam os três tipos de celulases que foram clonados, expressos e caracterizados a partir de uma diversidade de espécies microbianas (Gavaseraei *et al.* 2021; Khalid, *et al.* 2019; Kamal *et al.* 2018; Lopes; Martins, 2021; Siddique, *et al.* 2022).

Baseado nesses resultados e considerando a relevância da endoglucanase, sendo uma enzima biotecnologicamente aplicável, juntamente com as demais enzimas que compõem o complexo lignocelulolítico, ressalta-se a importância de buscar novas fontes microbianas dessa enzima, visto que trabalhos já reportados, demonstraram a produção de endoglucanases com estabilidade térmica, capacidade de hidrólise em ampla faixa de pH e tolerância a sais e líquidos iônicos

(Dos Santos *et al.* 2023; Gastelum-Arellanez; Paredes-López, 2014; Karmakar, *et al.* 2022; Silva, *et al.* 2018).

Santana (2010), explorou o potencial do fungo *M. perniciosa* por meio do cultivo submerso, para a produção de celulases, no qual, o complexo celulolítico obtido de *M. perniciosa* foi eficiente na hidrólise do bagaço-de-cana de açúcar e na redução da viscosidade do suco de caju, demonstrando que o fungo em estudo é uma excelente fonte de produção de enzimas do complexo celulolítico, apresentando características promissoras para aplicação em diferentes processos industriais.

Em trabalho anterior desenvolvido por Santana (2020), verificou-se a expressão de uma proteína hipotética da família GH45 do fungo *M. perniciosa* a partir da análise do DNA complementar (cDNA), sendo uma proteína envolvida da degradação de celulose utilizando como substrato resíduos celulolíticos, indicando-a como uma forte candidata para a produção recombinante. Esse fato, portanto, confere um caráter distintivo e inovador para este estudo.

Nesse contexto, é importante salientar que, até o momento não existem informações disponíveis na literatura acerca da produção recombinante dessa proteína proveniente do fungo *M. perniciosa*.

Neste sentido, o presente trabalho propõe realização de uma revisão de literatura sobre a produção recombinante de celulases fúngicas voltadas para a hidrólise de biomassa lignocelulósica, além disso, produzir e caracterizar uma endoglucanase do fungo *M. perniciosa*, cloná-la e expressá-la utilizando células de *Escherichia coli* em diferentes construções e condições, de modo a favorecer a produção dessa enzima em larga escala para a sua aplicação nos diversos setores industriais.

REFERÊNCIAS

- ASHOKKUMAR, V. *et al.* Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts-A critical review. **Bioresource technology**, v. 344, p. 126195, 2022.
- BAIG, K. S. Interaction of enzymes with lignocellulosic materials: causes, mechanism and influencing factors. **Bioresources and bioprocessing**, v. 7, p. 1-19, 2020.
- BARBOSA, F. C.; SILVELLO, Maria Augusta; GOLDBECK, Rosana. Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. **Biotechnology letters**, v. 42, n. 6, p. 875-884, 2020.
- BHAT, M. A. *et al.* Lignocellulosic biomass in circular economy: A techno-transition in carbon neutrality towards sustainable energy production. **Biomass and Bioenergy**, v. 189, p. 107349, 2024.
- CHEN, Y.; MU, T. Application of deep eutectic solvents in biomass pretreatment and conversion. **Green Energy & Environment**, v. 4, n. 2, p. 95-115, 2019.
- DADWAL, A.; SHARMA, S.; SATYANARAYANA, T. Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: Characteristics, recent advances and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 188, p. 226-244, 2021.
- DE SANTANA, C. S. *et al.* Molecular and structural characterization of cDNA from a cellulase of *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora. **Seven Editora**, 2023.
- DOS SANTOS, D. M. R. C. *et al.* Production, Purification, Characterization, and Application of Halotolerant and Thermostable Endoglucanase Isolated from *Pycnoporus sanguineus*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 10, p. 3211-3222, 2023.
- GASTELUM-ARELLANEZ, A.; PAREDES-LÓPEZ, O.; OLALDE-PORTUGAL, V. Extracellular endoglucanase activity from *Paenibacillus polymyxa* BEb-40: production, optimization and enzymatic characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 2953-2965, 2014.
- GAVASERAEI, H. R. *et al.* Identification, heterologous expression and biochemical characterization of a novel cellulase-free xylanase B from the thermophilic bacterium *Cohnella* sp. A01. **Process Biochemistry**, v. 107, p. 48-58, 2021.
- JAVANMARD, A. S.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, Ahmad Reza. Polycistronic cellulase gene expression in *Pichia pastoris*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-13, 2021.

JENSEN, M. S. *et al.* Discovery and characterization of a thermostable two-domain GH6 endoglucanase from a compost metagenome. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0197862, 2018.

JOHANSEN, K. S. Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 1, p. 143-149, 2016.

KAMAL, S. *et al.* Insights on heterologous expression of fungal cellulases in *Pichia pastoris*. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, p. 15-35, 2018.

KARMAKAR, M. *et al.* Purification, characterization, and application of endoglucanase from *Rhizopus oryzae* as antibiofilm agent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-19, 2022.

KHALID, A. *et al.* Optimization of Conditions for Maximal Production of Recombinant Thermostable Cellulase from *Thermotoga naphthophila* using E. coli BL21-CodonPlus (DE3) as Expression Host. **Pakistan journal of zoology**, v. 51, n. 4, 2019

LIU, M.; YU, H. Cocktail production of an endo- β -xylanase and a β -glucosidase from *Trichoderma reesei* QM 9414 in *Escherichia coli*. *Biochemical engineering journal*, v. 68, p. 1-6, 2012.

LOPES, A. M. M.; MARTINS, M.; GOLDBECK, R. Heterologous expression of lignocellulose-modifying enzymes in microorganisms: current status. **Molecular Biotechnology**, v. 63, p. 184-199, 2021.

MOREAU, C. *et al.* Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, p. 1-13, 2019.

OH, E. J.; JIN, Y-S. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. **FEMS yeast research**, v. 20, n. 1, p. foz089, 2020.

OLEMPСКА-BEER, Z. S. *et al.* Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, v. 45, n. 2, p. 144-158, 2006.

PATEL, M.; PATEL, H. M.; DAVE, S. Determination of bioethanol production potential from lignocellulosic biomass using novel Cel-5m isolated from cow rumen metagenome. **International journal of biological macromolecules**, v. 153, p. 1099-1106, 2020.

RAMAMOORTHY, N. K.; SAMBAVI, T. R.; RENGANATHAN, S. A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 148-158, 2019.

SALOMÃO, G. S. B. *et al.* Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1-6, 2019.

SANTANA, C. S. **Caracterização molecular e estrutural de uma endoglucanase de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA, 2010.

SANTANA, M. L. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa***. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA, 2010.

SIDDIQUE, F.; HON LAM, E. K.; RAYMOND WONG, W. K. Synergistic hydrolysis of filter paper by recombinant cellulase cocktails leveraging a key cellobiase, Cba2, of *Cellulomonas biazotea*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 990984, 2022.

SILVA, T. P. *et al.* Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresource technology**, v. 270, p. 263-269, 2018.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial enzymes—an overview. **Advances in enzyme technology**, p. 1-40, 2020.

SIQUEIRA, J. G. W. *et al.* Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Enhance production of fungal cellulase cocktail using cellulosic waste. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 100949, 2020.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Synthetic biology strategy for microbial cellulases: an overview. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 229-238, 2020.

SUKUMARAN, R. K. *et al.* Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: Targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi. **Bioresource Technology**, v. 329, p. 124746, 2021.

2 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar uma endoglucanase do fungo *Moniliophthora perniciosa* em sistema heterólogo com *Escherichia coli*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a literatura científica relacionada à produção recombinante de celulasas fúngicas para aplicação na hidrólise de biomassa lignocelulósica;
- Clonar o gene relativo à enzima endoglucanase a partir de diferentes construções de vetores;
- Expressar esse gene de forma recombinante em diferentes condições e cepas de *E. coli*;
- Purificar a enzima em sua forma ativa a partir de sistema heterólogo;
- Caracterizar o efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática da proteína recombinante.

CAPÍTULO I – PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE CELULASES FÚNGICAS PARA A HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA – UMA REVISÃO

Cleidineia Souza de Santana¹, Humberto Fonseca de Freitas¹, Helio Mitoshi Kamida¹, Luiz Henrique Machado de Oliveira¹, Raquel Guimarães Benevides²

¹ Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará

RESUMO

Os fungos compõem um grupo eucariótico diversificado, amplamente estudado por sua notável capacidade metabólica. Entre eles, os fungos filamentosos destacam-se pela produção de enzimas hidrolíticas envolvidas na decomposição de matéria orgânica, especialmente de substratos lignocelulósicos, matriz vegetal abundante e promissora para a produção sustentável de biocombustíveis e insumos químicos. Diferentes espécies fúngicas produzem o complexo celulolítico — endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases —, como é o caso do basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, patógeno do cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), cuja estratégia de infecção baseia-se na secreção de celulases termoestáveis que degradam a parede celular vegetal. Considerando a elevada demanda por enzimas eficientes e de baixo custo, esta revisão de literatura discute os avanços na produção recombinante de celulases de origem fúngica, com ênfase na hidrólise da biomassa lignocelulósica. Foram analisadas publicações científicas, priorizando estudos que abordam o isolamento de genes celulolíticos provenientes de fungos filamentosos e sua expressão heteróloga, especialmente em *Escherichia coli*. A literatura demonstra que o uso da tecnologia do DNA recombinante tem permitido o desenvolvimento de cepas microbianas capazes de expressar coquetéis enzimáticos sinérgicos e otimizados. *E. coli* destaca-se como hospedeiro preferencial devido à facilidade de manipulação genética, rápido crescimento, elevada densidade celular e ampla gama de vetores de expressão disponíveis. Os estudos apontam ganhos expressivos em rendimento enzimático, estabilidade proteica e redução de custos. Conclui-se que a produção recombinante de celulases fúngicas é uma alternativa viável e estratégica para suprir a demanda enzimática da indústria de biocombustíveis, contribuindo com soluções economicamente e ambientalmente sustentáveis.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*, endoglucanases, biocombustíveis, produção heteróloga, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Fungi comprise a diverse group of eukaryotes, widely studied for their remarkable metabolic capabilities. Among them, filamentous fungi are particularly notable for producing hydrolytic enzymes involved in the decomposition of organic matter, especially lignocellulosic substrates, an abundant and promising plant matrix for the sustainable production of biofuels and chemical feedstocks. Various fungal species produce the cellulolytic enzyme complex, composed of endoglucanases, exoglucanases, and β -glucosidases. as observed in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, a pathogen of the cacao tree (*Theobroma cacao* L.), whose infection strategy relies on the secretion of thermostable cellulases that degrade the plant cell wall. Given the growing demand for efficient and low-cost enzymes, this literature review discusses recent advances in the recombinant production of fungal cellulases, with an emphasis on lignocellulosic biomass hydrolysis. Scientific publications were analyzed, prioritizing studies focused on the isolation of cellulolytic genes from filamentous fungi and their heterologous expression, particularly in *Escherichia coli*. The literature demonstrates that recombinant DNA technology has enabled the development of microbial strains capable of expressing synergistic and optimized enzymatic cocktails. *E. coli* stands out as the host of choice due to its ease of genetic manipulation, rapid growth, high cell density, and wide availability of expression vectors. Studies have reported significant improvements in enzyme yield, protein stability, and cost efficiency. In conclusion, the recombinant production of fungal cellulases represents a viable and strategic approach to meet the enzymatic demands of the biofuel industry, contributing to economically and environmentally sustainable solutions.

Keywords: *Moniliophthora perniciosa*, endoglucanases, biofuels, heterologous production, *Escherichia coli*

1 INTRODUÇÃO

O reino dos fungos é composto por organismos eucarióticos distinguidos por paredes celulares quitinosas. Os fungos representam um reino extremamente diverso morfológicamente, fisiologicamente e ecologicamente. Um tipo distinto de fungos são os fungos filamentosos, os quais são diferenciados por um micélio composto de hifas septadas ou filamentos ramificados, divididos em seções distintas (Troiano *et al.* 2020; Wikandari *et al.* 2022).

Os fungos filamentosos têm sido extensivamente estudados para a decomposição de matéria orgânica e, mais especificamente, de substratos lignocelulósicos (Karnaouri *et al.* 2017; Kubicek, 2016; Liu; Qu, 2019; Madhavan *et al.* 2022).

O modo de crescimento filamentoso permite a colonização eficaz de substratos e facilita a absorção de nutrientes. Para que ocorra a absorção, polímeros em resíduos orgânicos, como hemicelulose e amido, precisam inicialmente ser degradados em pequenas moléculas como fonte de energia e carbono. Para tanto, os fungos secretam uma grande variedade e quantidade de enzimas (Sakekar *et al.* 2021; Wösten, 2019).

A Grande importância dos fungos filamentosos está também relacionada a extensa possibilidade de aplicações biotecnológicas, devido ao seu potencial para degradar eficientemente o material da parede celular das plantas e liberar monômeros de açúcar. Esses organismos utilizam seus recursos celulares para a produção de uma ampla gama de enzimas, incluindo celulasas e hemicelulasas (Cairns *et al.* 2021; Hassan, *et al.* 2019; Mózsik *et al.* 2021).

As enzimas celulasas fúngicas são comumente exploradas na indústria para biodegradação de biomassa em produtos úteis, a exemplo de biocombustíveis, com uma ampla gama de aplicações (Giovannoni *et al.* 2020; Kamal, *et al.* 2018).

Wang *et al.* (2020) relataram que mais da metade das proteínas comercialmente disponíveis foram produzidas por fungos filamentosos, os quais são descritos como fábricas de células poderosas e eficientes para a produção de proteínas em escala industrial.

Nesse contexto, esta revisão busca compilar os avanços recentes no campo da aplicação de enzimas celulolíticas por fungos filamentosos, com ênfase nas

estratégias de engenharia genética e bioprocessos que visam superar essas limitações. Ao sistematizar o conhecimento atual e apontar perspectivas futuras, o trabalho contribui para o desenvolvimento de soluções mais eficientes e economicamente viáveis, alinhadas com os princípios da bioeconomia circular. A compreensão aprofundada desses aspectos é fundamental para impulsionar a aplicação industrial das celulasas fúngicas, tornando os processos de conversão de biomassa mais sustentáveis e competitivos.

2 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE CELULASES

Tendo em vista a significância ecológica e comprovada aplicação industrial, os fungos filamentosos são amplamente utilizados como os principais produtores de enzimas hidrolíticas aplicados à degradação da biomassa lignocelulósica e estão recebendo cada vez mais atenção por seu papel preponderante na produção industrial (Chen *et al.* 2021; Giwa; Ali, 2023; Li *et al.* 202; Zhang, *et al.* 2020).

Os fungos filamentosos crescem como filamentos longos (hifas) de 2–10 µm de espessura em estruturas visíveis de rede intrincadas (micélio), podendo crescer em escala de centímetros a metros. Esses organismos representam um grupo abundante e diverso de espécies. Nos últimos anos, milhares de cepas de fungos já foram identificadas, caracterizadas, utilizadas e modificadas (Hüttner, *et al.* 2020; Kalra; Conlan; Goel, 2020; Mueller; Schmit, 2007; Strong, *et al.* 2022)

Adicionalmente, os fungos filamentosos dispõem de propriedades adequadas para fornecer uma contribuição multidimensional para a mitigação da poluição. Além do conjunto de enzimas, esses organismos apresentam uma variedade de produtos de valor agregado possíveis de serem produzidos e resultados sinérgicos quando co-cultivados com outros grupos de microrganismos (Anupma; Tamang, 2020; Kües, 2015).

Essas características concedem vantagem significativas para esses organismos, em função da facilidade de recuperação de biomassa do meio, da menor especificidade do substrato, maior biodisponibilidade do substrato e potencial para uma gama de processos (Alberti; Foster; Bailey, 2017; Ferreira; Varjani; Taherzadeh, 2020; Gmoser, *et al.* 2017).

As celulasas são enzimas sintetizadas principalmente por fungos que atuam degradando sistematicamente a biomassa celulósica em monômeros, os quais

podem ser posteriormente processados em vários produtos eficientes de valor agregado por meio de reações químicas e biológicas (Giwa; Ali, 2023; Kovács, et al. 2022).

Trabalhos já reportados demonstram a utilização dos fungos filamentosos para produção de celulasas com diferentes fins industriais, aplicada em inúmeras indústrias como, por exemplo, na indústria de alimentos, celulose e papel, fermentação, têxtil, agricultura, farmacêutica, biocombustível, dentre outras (Dutta et al. 2008; Akekar; Gaikwad, 2021; Guedes et al. 2014; He, et al. 2019; Ikeda, et al. 2007; Ouyang, et al. 2006; Prasetyo, et al. 2010; Singh, et al. 2021.).

Diversos gêneros de fungos são conhecidos por sua capacidade de produzir enzimas que constituem o complexo celulolítico (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase). Os gêneros de fungos filamentosos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola* e *Penicillium* corresponde aos grupos mais bem caracterizados como excelentes produtores de celulasas e utilizados industrialmente para a produção dessas enzimas, usando fermentação submersa (FS), fermentação em estado sólido (FES), bem como estratégias recombinantes (Castro; Pereira Jr, 2010; Farinas; Barboza, 2012; Foreman et al. 2003; Pacheco, 2016; Pimentel, 2019).

Na Tabela 1 estão representados alguns trabalhos utilizando fungos filamentosos para produção de celulasas.

Tabela 1: Revisão da utilização de fungos filamentosos para produção de celulasas por fermentação submersa (FS) e por fermentação em estado sólido (FES)

Espécie	Enzima	Método de Produção	Autores
<i>Aspergillus flavus</i>	Endoglucanase	FES	Ain, et al. (2022)
<i>Trichoderma orientalis</i>	endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase	FS	Giwa; Ali; Akhter, (2023)
<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus awamori</i>	endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase	FS	Naher et al. 2021
<i>Trichoderma reesei</i> RP698 e <i>Mycothermus thermophilus</i>	endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase	FS	Scarcella, et al. 2021
<i>Aspergillus niger</i>	endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase	FES	Rodríguez-Zúñiga et al. (2011)
<i>Trichoderma reesei</i>	Endoglucanase	FES	Pessoa, et al. (2021)

<i>Moniliophthora perniciosa</i>	β -glicosidases	FS	Almeida, et al. (2022)
<i>Penicillium funiculosum</i>	endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase	--	Karboune et al. (2008)
<i>Trichoderma reesei</i> AI-K1 149	endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase	FES	Alarjani et al. (2024)

-- Dados não fornecidos

Fonte: Autoria própria

3 *Moniliophthora perniciosa*: FITOPATÓGENO PRODUTOR DE CELULASES AINDA POUCO EXPLORADAS

O fungo *Moniliophthora perniciosa* (Aime e Phillips-Mora, 2005) é um basidiomiceto hemibiotrófico, o agente responsável por causar a doença conhecida como vassoura-de-bruxa (VDB) que infecta o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) (Mares, et al. 2020; Patrocínio et al. 2017).

A doença se alastrou em todos os países produtores de cacau da América do Sul e no Caribe, resultando em uma diminuição na produção de cacau e, conseqüentemente, gerando uma grave crise econômica (Gomes, et al. 2021; Mares, et al. 2020).

No contexto brasileiro, a propagação da vassoura-de-bruxa nas regiões produtoras do estado da Bahia, entre os anos de 1989 e 2000, ocasionou uma queda na produção anual de grãos de cacau, levando a uma redução de 400.000 para 120.000 toneladas métricas. Tal cenário teve impactos significativos na região, desde falência de inúmeros produtores a desvalorização das terras (Bowers et al. 2001).

Moniliophthora perniciosa é um patógeno hemibiotrófico, caracterizado por apresentar dois estágios infecciosos distintos: um estágio biotrófico, crescendo nos tecidos vivos do hospedeiro e uma fase necrotrófica, se alimentando do tecido morto (Auhing Arcos, et al. 2021; Paschoal, et al. 2022).

Baseado na interação hemibiotrófica, o *M. perniciosa* é considerado um patógeno hemibiotrófico atípico, visto que, a maioria das interações hemibiotróficas apresenta um estágio biotrófico curto e assintomático, com duração de apenas alguns dias, enquanto em *M. perniciosa* a fase biotrófica é longa com duração de um a três meses (Costa et al. 2021; Teixeira et al. 2015).

No processo de infecção, o fungo causa hipertrofia e hiperplasia dos tecidos vegetais, perda de dominância apical e proliferação de brotações axilares resultando na formação de caules anormais denominados de vassouras verdes, sendo esse o estágio biotrófico; no estágio necrotrófico, o fungo causa a necrose e morte dos tecidos infectados, produzindo a vassoura seca (Barsottini, *et al.* 2020; Carvalho, *et al.* 2013; Sena *et al.* 2014).

Nos tecidos necróticos infectados ocorrem a produção de basidiocarpos de coloração rosa (Figura 1) produzindo milhões de esporos, os quais são dispersos pela chuva e pelo vento, principalmente durante a noite, em condições ótimas de temperatura e umidade, podendo permanecer latentes no solo ou dentro de ramos de plantas podadas por longos períodos (Ferraz, *et al.* 2021; Garcia *et al.* 2007).



Figura 1: Fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causador da doença vassoura-de-bruxa.
Fonte: Rosa (2015)

Moniliophthora perniciosa é também conhecido por infectar outros hospedeiros, sendo classificado em diferentes biótipos a saber, biótipo C, S, H e L, descritos com base na adaptação do hospedeiro (Artero *et al.* 2017; Carvajal-Rivera *et al.* 2021; Pampañaupa *et al.* 2021). O biótipo C é descrito por infectar espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*, membros da família Malvaceae; o biótipo S infecta membros da família Solanaceae; o biótipo L são descritos em cipós florestais, pertencente à família Bignoniaceae, enquanto o biótipo H infecta membros das Malpighiaceae (Griffith; Hedger, 1994; Meinhardt, *et al.* 2008; Rincones *et al.* 2006; Resende *et al.* 2000).

Essa estratégia de infecção de *M. pernicioso* ocorre pela produção de celulases. A parede celular vegetal é constituída majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Para infectar a planta, o fungo precisa quebrar esses polímeros por meio da ação de enzimas hidrolíticas secretadas, possibilitando que atravessem a parede celular, permitindo que o fungo infecte diferentes órgãos de *T. cacao* L. e desencadeie a doença vassoura-de-bruxa do cacau (Carvajal-Rivera *et al.* 2022; Meraz-Pérez *et al.* 2021; Santana, 2010).

É possível encontrar dados recentes na literatura sobre a produção de enzimas celulases pelo fungo *M. pernicioso*. A carboximetilcelulase foi investigada por Santana *et al.* (2023), apresentando uma promissora estabilidade térmica, apresentando pH ótimo de 7,2 e temperatura de 47°C, além disso, reteve atividade residual em torno de 88,66% a 90 °C após 30 minutos de incubação

A produção da enzima de β -glicosidase proveniente de *M. pernicioso*, por sua vez, foi estudada por Almeida *et al.* (2022) a partir do extrato bruto contendo β -glicosidase, apresentando valores ideais de atividade enzimática em pH 4,5 e temperatura de 60 °C. Os autores destacaram ainda que a β -glicosidase (BGL) também foi estável nas temperaturas observadas no intervalo de 50 a 90° C.

Vitor *et al.* (2024), descreveram a produção de uma β -glucosidase recombinante em células de *E. coli*, a qual demonstrou atividade hidrolítica em pH 5,0 à temperatura de 60 °C, indicando que a aplicação da β -glucosidase recombinante na hidrólise de materiais lignocelulósicos pode ser eficiente.

Santana (2020), detectou a expressão de uma proteína hipotética da família GH45 do fungo *M. pernicioso* envolvida na degradação de celulose utilizando como substrato resíduos celulolíticos, indicando uma grande possibilidade para expressão heteróloga para futuras aplicações biotecnológicas relacionadas a conversão de biomassa em produtos de valor agregado.

Dessa forma, a capacidade patogênica desse fungo, que necessita degradar a parede celular vegetal para colonizar seu hospedeiro, sugere uma maquinaria enzimática altamente especializada, tornando-o um candidato promissor para aplicações em biotecnológicas. A expressão heteróloga dessa enzima pode otimizar processos de conversão de biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado, como biocombustíveis e bioprodutos, alinhando-se às demandas por tecnologias sustentáveis.

4 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica, matéria orgânica derivada de resíduos agrícolas e florestais, vem se destacando como uma fonte de energia renovável, sendo amplamente reconhecida como uma valiosa fonte passível de conversão em biocombustíveis (Banu, *et al.* 2021; Yogalakshmi, *et al.* 2022).

Os principais constituintes da biomassa lignocelulósica são: a celulose compreendendo aproximadamente 30 - 50% da fibra, lignina, que abrange entre 23 - 32% e hemicelulose variando entre 15 a 25% (Figura 2). A celulose, formada por unidades β -1,4-glicosil, destaca-se como o principal componente da lignocelulose, sendo a glicose o açúcar mais predominante resultante da hidrólise (Oh; Jin, 2020; Prieto *et al.* 2021; Singh, *et al.* 2021).

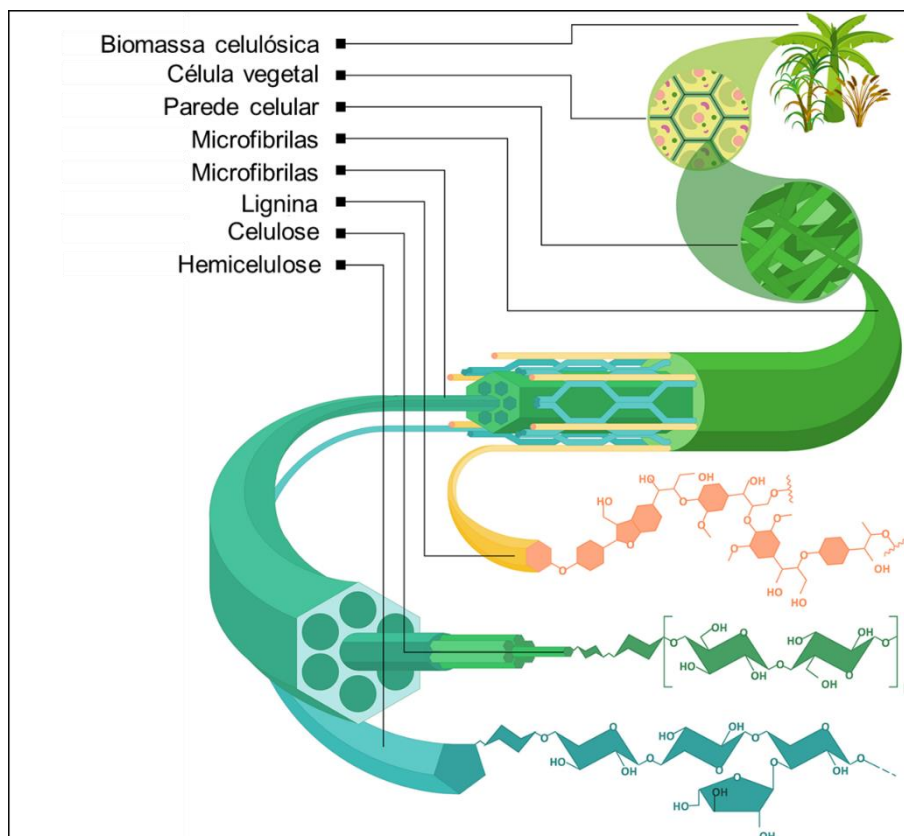


Figura 2: Representação dos principais componentes da biomassa lignocelulósica.
Fonte: Magalhães Jr., *et al.* (2019)

Biomassas lignocelulósicas derivadas da cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz são abundantes na natureza e podem ser transformados em diversos bioprodutos (Figura 3) por possuírem um excelente potencial para gerar produtos

químicos e combustíveis de forma sustentável, além de ser uma matéria prima de baixo custo (Pachauri *et al.* 2020; Saini *et al.* 2015).

Assim, os esforços de pesquisa sobre bioconversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis estão orientados para o desenvolvimento de processos custo-efetivos que possam competir com os existentes (Srivastava *et al.* 2018; Srivastava, *et al.* 2023).

A conversão desses resíduos em energia é um aspecto importante no cenário atual e tem ganhado interesse em todo o mundo. Produtos de valor agregado, como os biocombustíveis podem ser produzidos por meio de vários processos de conversão biológica e termoquímica a partir desses materiais. Na conversão biológica dessa biomassa, a hidrólise enzimática da celulose é uma etapa fundamental (Lan *et al.* 2020; Singh, *et al.* 2021).

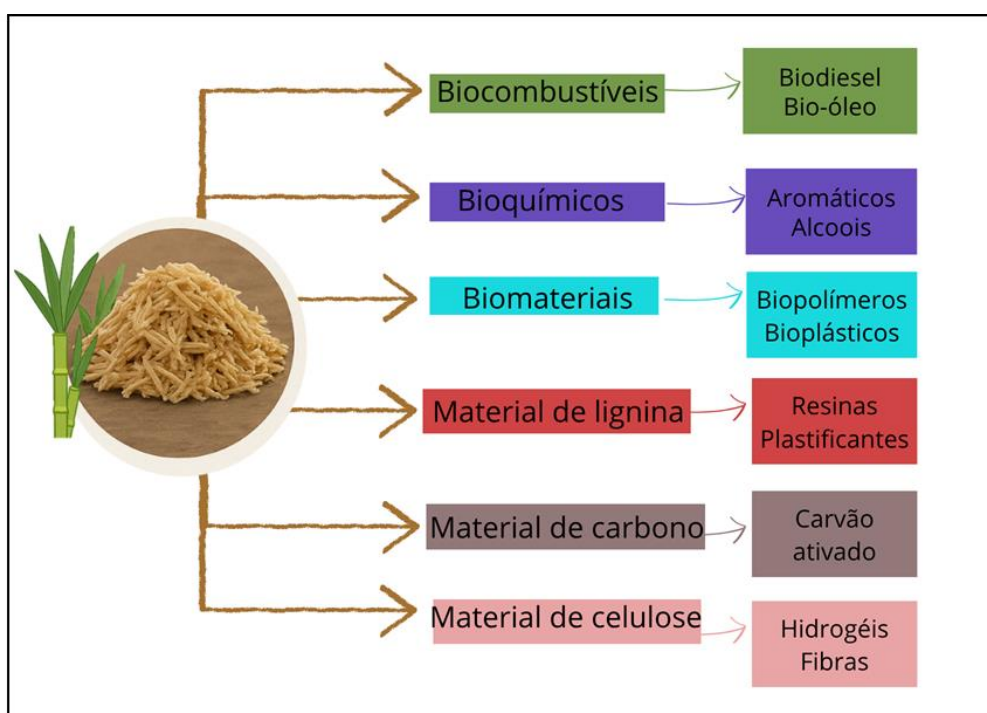


Figura 3: Aplicações Industriais Especializadas da Biomassa Lignocelulósica.
Fonte: autoria própria

A conversão enzimática de materiais lignocelulósicos renováveis em biocombustíveis é uma alternativa ecológica e sustentável aos combustíveis fósseis, contudo, a natureza complexa e recalcitrante desses materiais tem sido o principal gargalo na utilização desses recursos para a produção de bioenergia. Com

isso, existe uma enorme demanda por enzimas celulasas que podem ser posteriormente utilizadas nas indústrias (Baruah *et al.* 2018; Devi *et al.* 2022).

Os microrganismos desenvolveram a capacidade de degradar a lignocelulose produzindo enzimas especializadas. Várias atividades catalíticas com diferentes papéis na conversão de lignocelulose foram identificadas, refletindo a complexidade e diversidade de substratos naturais (Jessen *et al.* 2021).

Para viabilizar processos industriais de degradação da lignocelulose e superar suas barreiras, a identificação e caracterização de enzimas celulolíticas eficientes, especialmente as derivadas de microrganismos especializados, tornam-se essenciais. Desse modo, o investimento contínuo em pesquisas que explorem novas vias biocatalíticas e sinergias enzimáticas é fundamental para impulsionar a bioeconomia e a produção sustentável de bioenergia.

5 CELULOSE E CELULASES

A celulose, principal componente da biomassa vegetal, é o polissacarídeo mais abundante na terra. Corresponde a um polímero linear que consiste em resíduos de D-glicose (β -1,4-glicosil) unidos por ligação do tipo β -1,4 (Figura 4), formando assim uma microfibrila (Bhatia *et al.* 2020; Patel; Shah, 2021).

Essas cadeias de glicose são fortemente ligadas por ligações de hidrogênio para formar materiais fibrosos insolúveis. O polímero celulósico tem sido descrito por um modelo de duas fases, consistindo de fases cristalinas e amorfas, muitas vezes interrompidas por uma série de estruturas semicristalinas, o que o torna difícil de ser utilizado por enzimas ativas de carboidratos (Wang, *et al.* 2020).

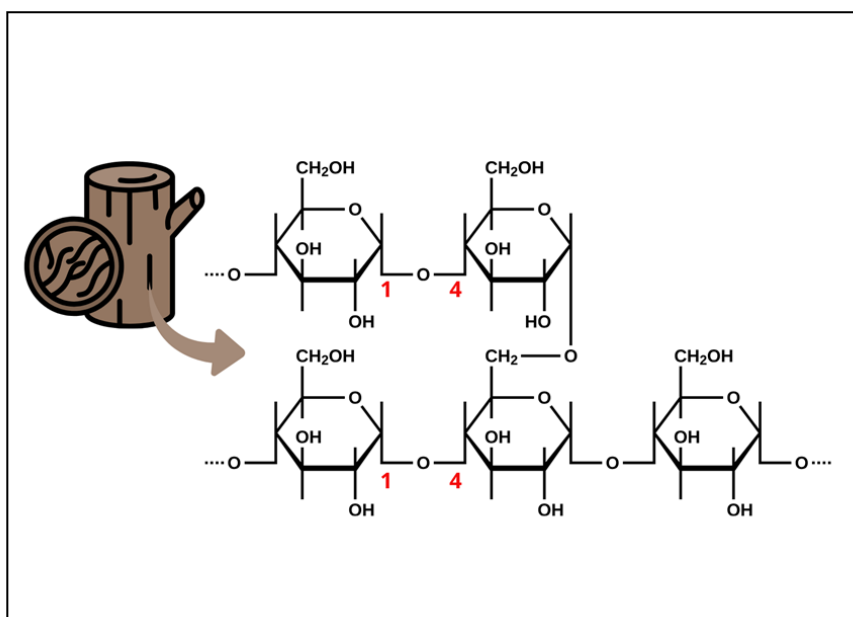


Figura 4: Estrutura da celulose apresentando os monômeros de glicose ligados por ligações glicosídicas do tipo β -1,4.
Fonte: autoria própria

Essas estruturas complexas de cadeia de açúcar conferem à parede celular da planta uma notável resistência. Os microrganismos têm dificuldades em quebrar essas ligações de açúcar entre as paredes celulares das plantas, contudo, há uma variedade de microrganismos descritos com potencial para degradação do material celulósico, dentre eles os basidiomicetos do gênero *Moniliophthora* (Biswas, *et al.* 2020; Mokale Kognou *et al.* 2022).

A fração celulósica presente na biomassa pode ser decomposta por um conjunto de enzimas extracelulares livres, produzidas por bactérias ou fungos. A hidrólise enzimática da celulose compreende três categorias principais de glicosil hidrolases (GHs) (Figura 5): as endoglucanases (EG) EC 3.2.1.4; as celobiohidrolases ou exoglucanases (CBH) EC 3.2.1.91 e as β -glicosidases (BGLs) EC 3.2.1.21 (Ferreira *et al.* 2021; Okolie, *et al.* 2021).

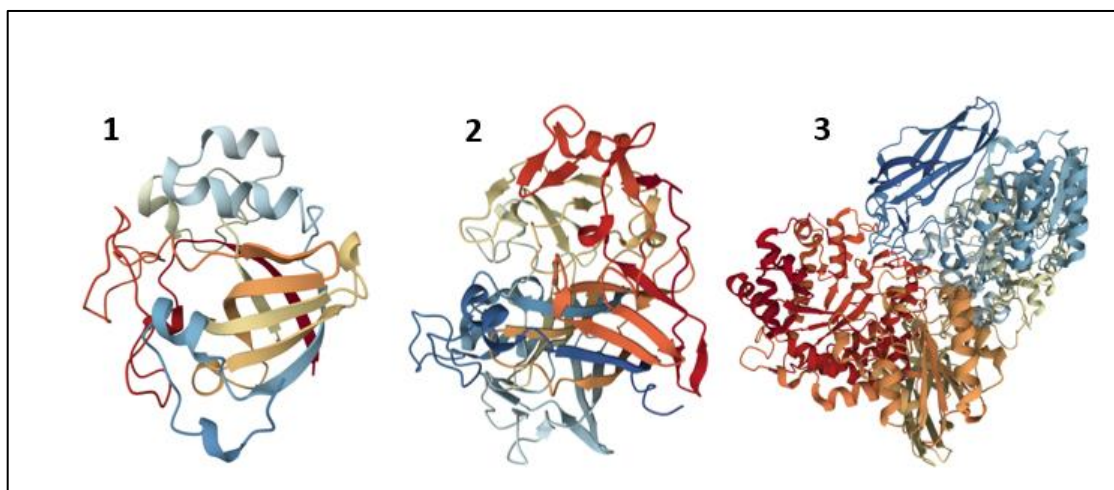


Figura 5: Estrutura tridimensional das celulasas típicas, disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). **1:** Estrutura tridimensional de uma endoglucanase de *Humicola insolens* PDB 2ENG; **2:** Estrutura tridimensional de uma celobiohidrolase de *Trichoderma harzianum* PDB 2Y9N; **3:** Estrutura tridimensional de uma β -glicosidase de *Listeria innocua* PDB 4ZOA.
Fonte: Protein Data Bank

Na fibra celulósica, o mecanismo de ação dessas enzimas ocorre pela ação das endoglucanases (EGs) que clivam aleatoriamente as regiões amorfas internas da celulose, levando à produção de oligossacarídeos com a exposição de novas extremidades da cadeia. Subsequentemente, exoglucanases ou celobiohidrolases (CBHs), hidrolisam as extremidades redutoras ou não redutoras expostas nas cadeias de celulose, liberando celobiose. Por fim, as β -glucosidases (BGLs) hidrolisam a ligação β -1,4 glicosídica da celobiose para liberar glicose (Oh; Jin, 2020; Thoresen *et al.* 2021). Os monooxigenases de polissacarídeos líticos (LPMOs), categorizadas como atividades auxiliares, contribuem para a divisão da cadeia polissacarídica ao aproveitar a capacidade oxidativa do oxigênio molecular para clivar uma ligação CDH glicosídica (Figura 6) (Salgado *et al.*, 2018; Moreau *et al.*, 2019; Eijsink, *et al.*, 2019).

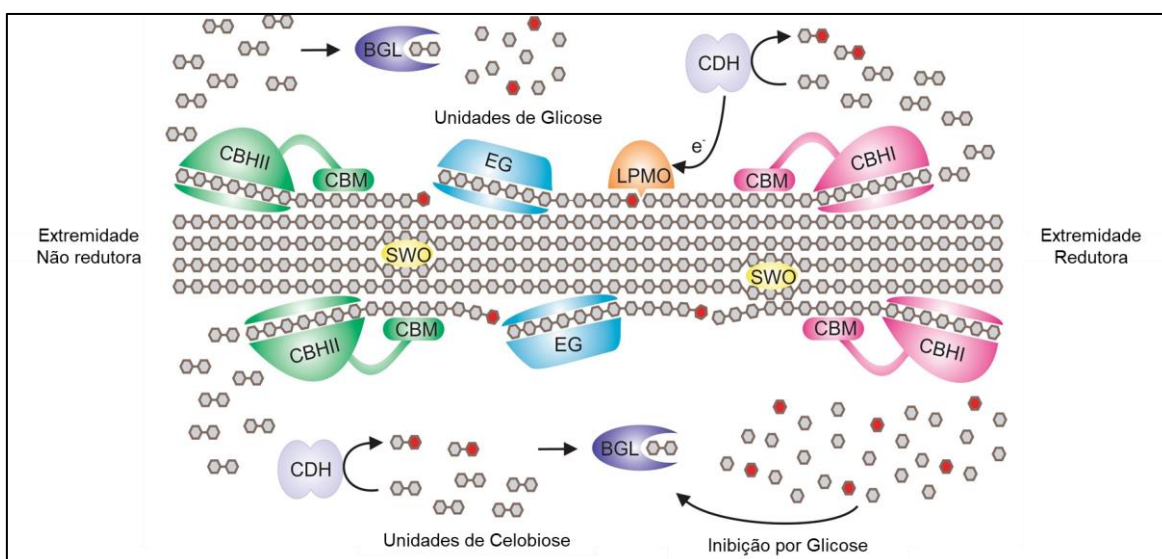


Figura 6: Representação do mecanismo de ação das enzimas celulolíticas e das LPMOs na fibra celulósica.

Fonte: Adaptado de Salgado *et al.* (2018).

A produção comercial de celulase está disponível há mais de 30 anos, e são importantes como alvos potenciais tanto na indústria quanto nas pesquisas acadêmicas. Estudos avançados sobre enzimas celulases mostram seu potencial biotecnológico em setores industriais envolvendo indústria têxtil, processamento de alimentos, detergente, agricultura, ração animal, indústria de papel e celulose, e biorrefinarias (Tabela 2) (Bhati *et al.* 2021; Bilal *et al.* 2020; Chung *et al.* 2014; Cipolatti *et al.* 2019; De Souza *et al.* 2021; Guerrand, 2018; Sharada *et al.* 2014; Singh; Kumar, 2019; Singh *et al.* 2019; Srivastava *et al.* 2015).

Tabela 2: Celulases produzidas por fungos filamentosos e suas aplicações.

Celulase	Fonte microbiana	Substrato	Rendimento	Aplicação	Referência
Endoglucanase	<i>Tricoderma reesei</i> RUT C30	Farelo de trigo	15,0 U/mL	Produção de bioetanol	Sukumaran <i>et al.</i> (2009)
Endoglucanase	<i>Aspergillus niger</i> MTCC 7956	Farelo de trigo	6,77 U/mL	Bioconversão da biomassa lignocelulósica	Zhang <i>et al.</i> (2018)
Celulase	<i>T. reesei</i> QMY-1	Palha de Trigo	17,2 IU/mL; 430 IU/g	Hidrólise de biomassa	Chahal <i>et al.</i> (1985)
Endoglucanase	<i>Penicillium citrinum</i>	Farelo de trigo	1,89 UI/ml	Aditivos para detergentes	Dutta <i>et al.</i> (2008)

Fonte: Autoria própria

Além disso, pesquisas recentes têm focado na conversão industrial de biomassa contendo celulose para produzir etanol como combustível alternativo (Areeshi, 2022; Aqeel *et al.* 2024; Barzegar, *et al.* 2021; Dechellis *et al.* 2024; Narisetty *et al.* 2023).

Sumariamente, a produção comercial de celulasas, aliada à sua versatilidade comprovada em diversas aplicações industriais, reforça sua importância como alvos estratégicos em pesquisa e desenvolvimento. Com o crescente foco na bioeconomia e na busca por combustíveis alternativos, como o bioetanol, torna-se ainda mais crucial, impulsionando a pesquisa contínua para otimizar sua aplicação na conversão sustentável de recursos lignocelulósicos

6 ENDOGLUCANASE

As endoglucanases (EG) (EC 3.2.1.4) pertencem ao amplo grupo da família O-glicosil hidrolase (GH) e estão entre as primeiras enzimas aplicadas em processos industriais como de acabamento têxtil, drenagem de papel e celulose ou preparações detergentes (Amengual, *et al.* 2022; Siqueira, *et al.* 2019).

Essas enzimas atuam nas regiões amorfas da celulose clivando as ligações β -1,4-glicosídicas da cadeia, formando novos terminais que poderiam ser acessados pelas celobiohidrolases para gerar moléculas de celobiose, que são adequadas para hidrólise por β -glicosidases, produzindo glicose como produto final (Berto, *et al.* 2019; Escuder-Rodríguez *et al.* 2022).

No banco de dados CAZy, as enzimas com atividade de endoglucanase foram classificadas até agora em 14 famílias diferentes (GH5, GH7, GH8, GH9, GH10, GH12, GH26, GH44, GH45, GH48, GH61, GH74, GH124 e GH148), com base na semelhança de sequência de proteínas e estrutura do domínio catalítico (Amengual, *et al.* 2022; Hu, 2020).

Embora as EGs catalisem a mesma reação bioquímica, elas diferem em seu mecanismo catalítico ácido, inversão ou retenção da configuração anomérica da glicose. Essas enzimas possuem estrutura terciária semelhante e única, particularmente no sítio ativo, embora suas sequências possam não ser homólogas. Algumas endoglucanases também possuem um ou mais módulos de ligação a carboidratos (CBM), o qual auxilia a enzima a se ligar à celulose, podendo também participar da ruptura inicial das fibras de celulose (Siqueira, *et al.* 2019).

Há um alto nível de colaboração observado entre endoglucanases e exoglucanases (celobiohidrolases), e é essa energia cooperativa que é necessária para a hidrólise dos polímeros de celulose (Bhati, *et al.* 2021).

Dessa forma, as endoglucanases são enzimas que apresentam aplicações industriais consolidadas, apresentando um papel fundamental na degradação da celulose, a reconhecida sinergia observada entre EGs e exoglucanases é essencial para a eficiência da hidrólise dos polímeros de celulose, evidenciando a complexidade e a relevância dessas enzimas para a bioconversão de biomassa.

7 EXOGLUCANASE/CELOBIOHIDROLASE

As exoglucanases/celobiohidrolases (CBHs) (EC 3.2.1.91) são enzimas que atuam na hidrólise da celulose de suas extremidades de cadeia, por meio de um mecanismo de retenção, produzindo celobiosídeos curtos como produtos. Sob condições favoráveis, algumas exoglucanases também podem realizar reações de transglicosilação (Mafa, *et al.* 2020).

Essas enzimas desempenham papéis fundamentais na degradação da celulose cristalina é um componente fundamental da parede celular vegetal. A alta atividade hidrolítica das CBHs contra a celulose cristalina é alcançada pela estrutura única do domínio catalítico (CD), que consiste em sítios de ligação ao substrato em forma de túnel cobertos por alças (Nakamura, *et al.* 2020).

Um dos fatores mais importantes que influenciam a eficiência da degradação da celulose cristalina recalcitrante é a processabilidade das celobiohidrolases (CBHs) que degradam a celulose em produtos solúveis. A processividade é definida como a capacidade das celulasas de catalisar a degradação contínua de uma cadeia de celulose através de reações catalíticas hidrolíticas sucessivas sem dissociação da cadeia (Uchiyama, *et al.* 2020).

De acordo com o banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>), (Cantarel *et al.*, 2009) a exoglucanase (EC 3.2.1.91) atua nas extremidades não redutoras encontradas em GH5, GH6 e GH9, enquanto a exoglucanase (EC 3.2.1.176) atua nas extremidades redutoras presentes em GH7, GH9, GH48 (Singh, *et al.* 2021).

Portanto, as exoglucanases/celobiohidrolases (CBHs), com sua notável capacidade de hidrolisar as extremidades da celulose cristalina através de um mecanismo de retenção, são essenciais para a degradação desse biopolímero

recalcitrante. Sua capacidade de atuar em diferentes terminações (redutoras e não redutoras), amplia seu potencial biotecnológico na conversão de biomassa.

8 β -GLICOSIDASE

As β -glicosidases (β -D-glucoside, glucohidrolase, EC 3.2.1.21) pertencem ao grupo das glicosil hidrolases (GH) e são categorizadas nas seguintes famílias GH1, GH2, GH3, GH5, GH30, GH39 e GH116 (De Almeida, 2020; Liew *et al.* 2018; ZANG, *et al.* 2018). Dentre essas famílias, a GH1 e a GH3 são as que possuem o maior número de membros (Huang *et al.* 2021).

As β -glicosidases (BGLs) estão envolvidas nas etapas finais da degradação da celulose e atuam na hidrólise da celobiose e outros celooligossacarídeos liberando unidades de glicose (Zhang *et al.* 2021).

No processo de hidrólise enzimática da biomassa, as BGLs desempenham um papel central, sendo responsáveis por quebrar as moléculas de celobiose, produzidas pela ação das enzimas endoglucanase e celobiohidrolases, em unidades de glicose (Karami *et al.* 2020; Sathe, *et al.* 2017).

Genes codificantes de β -glicosidases são encontrados em uma série de organismos, abrangendo microrganismos, a exemplo de fungos filamentosos (Hao, *et al.* 2020; Zhao *et al.* 2020), plantas e animais (Sorensen, *et al.* 2013; Raza, *et al.* 2020).

Dentre esses, os microrganismos são preferidos devido a facilidade de manipulação, sendo os fungos a fonte preferencial da obtenção de enzima, visto que, as enzimas fúngicas são apontadas por apresentarem atividade eficiente e alta estabilidade térmica (Califano *et al.* 2020; Kannan *et al.* 2023).

Essas enzimas têm sido amplamente exploradas em aplicações na produção de alimentos, ração animal, bebidas, indústrias de biocombustíveis e outros campos comerciais (Huang *et al.* 2021; Nigam *et al.* 2018; Tran *et al.* 2023; Zhang *et al.* 2021).

À vista disso, as β -glicosidases (BGLs) desempenham um papel indispensável na hidrólise final da celobiose em glicose, complementando a ação das endoglucanases e celobiohidrolases na degradação eficiente da biomassa lignocelulósica. A versatilidade dessas enzimas em setores como biocombustíveis, destaca seu potencial industrial.

9 PRODUÇÃO DE CELULASES RECOMBINANTES

As enzimas celulases, geralmente fornecidas como um coquetel de endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), têm sido consideradas um dos fatores mais caros para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. O alto custo das celulases, responde por aproximadamente 40-50% do custo total de produção de etanol (Bussler *et al.* 2021; Kuhad *et al.* 2016; Shi *et al.* 2017; Srivastava *et al.* 2019).

Nesse sentido, esforços para reduzir o custo de produção de celulases têm se concentrado em uma série de variáveis, a exemplo da produção de enzimas recombinantes visando uma melhoria na produtividade com capacidade industrialmente superiores (Li *et al.* 2022; Onuma *et al.* 2019; Park *et al.* 2018; Yildirim; Çelik, 2017).

A tecnologia do DNA recombinante permite a criação de cepas microbianas que expressam conjuntos de enzimas adaptadas e sinergicamente ativas, dentro de uma única célula ou combinando diferentes cepas, levando a rendimentos de enzimas em um nível economicamente viável (Lambertz, 2014).

Dessa forma, com base em dados reportados, a expressão de enzimas celulolíticas na forma heteróloga é uma estratégia promissora para a produção de catalisadores celulares, visando a geração de combustíveis e produtos químicos a partir da celulose (Chetty *et al.* 2022; Inokuma *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023).

Trabalhos anteriores envolvendo a produção de celulases recombinantes sugerem a importância dessas enzimas funcionarem de maneira sinérgica, semelhante às celulases fúngicas, onde duas ou mais celulases estão presentes em uma proporção específica e são componentes essenciais para a hidrólise completa (Chetty *et al.* 2022; Davison *et al.* 2020; Liu *et al.* 2017).

A utilização de enzimas celulolíticas recombinantes representa uma abordagem estratégica promissora para viabilizar economicamente a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. A expressão heteróloga de celulases com atividade sinérgica, inspirada na eficiência dos sistemas enzimáticos fúngicos, pode otimizar a hidrólise da celulose e reduzir significativamente os custos do processo.

10 EXPRESSÃO DE CELULASES EM *Escherichia coli*

Escherichia coli está entre os sistemas de expressão mais utilizados para a síntese de proteínas heterólogas, devido a combinação de diferentes vantagens, incluindo altas taxas de crescimento e o rendimento de produção alcançadas, amplo conhecimento de seu metabolismo e genoma e sua fácil capacidade de transformação com DNA exógeno (Benito *et al.* 2022; Miret *et al.* 2020).

As células de *E. coli* são descritas e experimentalmente verificadas como eficientes para incorporar o DNA exógeno e expressar proteínas recombinantes com altas taxas (Cronan, 2014; Kaur *et al.* 2018; Terpe, 2006).

A *E. coli* é o hospedeiro mais comum para a expressão de enzimas celulolíticas recombinantes, a fim de aumentar a produção dessas enzimas e minimizar o custo total das aplicações industriais de celulose (Ferreira *et al.* 2018; Kim; Ku, 2018).

Ao consultar a literatura, é possível identificar uma variedade de estudos relacionados à produção de celulases utilizando *E. coli* como organismo hospedeiro. Esses trabalhos demonstram rendimentos substanciais e atividade hidrolítica adequada para aplicações biotecnológicas. A Tabela 3 apresenta uma síntese referente a algumas dessas proteínas utilizando a *E. coli* como sistema hospedeiro.

Tabela 3: Celulases recombinantes de origem microbiana utilizando *E. coli* como sistema hospedeiro.

Enzima	Organismo de origem	Sistema de clonagem e expressão	Solubilidade	Rendimento e atividade específica	Autores
Celobiohidrolase	<i>Lentinula edodes</i>	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)/ pET11d	Solúvel	--	Taipakova <i>et al.</i> (2011)
Celobiohidrolase	<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/ pET-28a	Solúvel	85 U/mg .	Dadwal <i>et. al.</i> (2021)
Endoglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3) / pET22b (+)	Solúvel	--	Nakazawa <i>et al.</i> (2008)
Endoglucanase	<i>Paenibacillus sp.</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/ pET-28a(+)	--*	3,635 U/mg	Dhar <i>et al.</i> (2015)
Endoglucanase	<i>Trichoderma virens</i>	BL21(DE3)/pET-32a-EG	Solúvel	--	Zeng <i>et al.</i> (2016)

B-glicosidase	<i>Humicola insolens</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/ pET28a (+)	Solúvel	1,3 U/mg	Souza, et. al. (2014)
B-glicosidase	<i>Auricularia heimuer</i>	<i>E. coli</i> BL21/ pET-32a	--	--	Sun et. al. (2020)
B-glicosidase	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/ pET28-a(+)	Solúvel	24 U/mg	Vázquez-Ortega et al., (2022)
B-glicosidase	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) / pET-28a (+)	Solúvel	--	Vitor et al. (2024)

--Dados não fornecidos

Fonte: autoria própria

Portanto, a *Escherichia coli* consolida-se como um sistema de expressão altamente eficiente e amplamente explorado na produção de celulasas recombinantes, combinando vantagens operacionais com elevado rendimento enzimático. A robustez desse microrganismo, aliada ao domínio técnico sobre sua manipulação genética, favorece sua aplicação em processos industriais voltados à conversão da celulose em produtos de valor agregado.

11 CEPAS DE *E. coli* UTILIZADAS COMO HOSPEDEIROS

Escherichia coli tem sido o meio mais popular de produção de proteínas recombinantes de origem procariótica e eucariótica. A fácil manipulação do genoma de hospedeiros unicelulares como *E. coli*, é sua principal vantagem sobre organismos multicelulares. Além disso, diferentemente de organismos multicelulares, a transformação de bactérias é simples, altamente eficiente e econômica (Kaur et al. 2018).

A produção de proteína recombinante em *E. coli* envolve vários fatores, dentre eles, a escolha da cepa hospedeira é um fator importante. Ao escolher a cepa hospedeira ideal para expressar o gene de interesse, deve ser levado em consideração as características do produto do gene. Uma grande variedade de cepas hospedeiras de *E. coli* já foi selecionada e testada para expressão eficiente de proteínas as quais são projetadas para fins específicos. (Falak et al. 2022; Pouresmaeil; Azizi-Dargahlou, 2023; Watts et al. 2021).

Escherichia. coli BL21 e suas cepas derivadas têm sido há muito tempo utilizadas para inúmeras aplicações biotecnológicas, sobretudo para a produção de proteína recombinante. A *E. coli* BL21(DE3) corresponde a uma importante

hospedeira com capacidade industrial, incluindo rápido crescimento celular em meios mínimos, baixa abundância de protease e uma receptividade à cultura de alta densidade (Gomes *et al.* 2016; Kim, *et al.* 2017; Wagner *et al.* 2008).

Além disso, as linhagens BL21(DE3) pLysS, também são amplamente utilizadas para verificar a expressão de proteína, possui características semelhantes à BL21(DE3), contudo, a pLysS produz lisozima T7 de tipo selvagem para reduzir a expressão basal de T7 do gene de interesse. A *E. coli* BL21Star (DE3) é um hospedeiro mutado permitindo um aumento na produção de proteínas recombinantes solúveis (Falak *et al.* 2022; Viegas *et al.* 2005)

Um dos desafios da produção heteróloga de proteínas é a formação inadequada de ligações dissulfeto, levando à inativação e agregação de proteínas. Dessa forma, algumas cepas de *E. coli* são projetadas para superar esse problema, a exemplo das linhagens Rosetta 2, Rosetta (DE3), Rosetta pLysS, Roseta (DE3) pLacI, as quais têm sido amplamente utilizadas para aumentar a expressão de proteínas que contêm códons raros, bem como, sendo descrita para a produção de proteínas solúveis que requerem formação de ligação dissulfeto com alto rendimento (Falak *et al.* 2022; Gomes *et al.* 2016; Joseph *et al.* 2015; Morão *et al.* 2022).

Dessa forma, a diversidade de cepas de *E. coli* disponíveis oferece uma gama de possibilidades para a expressão otimizada de proteínas recombinantes, permitindo adequar o sistema hospedeiro às características específicas do gene-alvo e do produto proteico desejado.

12 VETORES DE CLONAGEM - pET32a e pET28a

Na clonagem molecular, um vetor refere-se a uma molécula de DNA que atua como um meio de transporte para introduzir material genético externo em uma célula de forma artificial. Nessa célula, esse material pode ser replicado ou expresso, como é o caso dos plasmídeos (Khananisho *et al.* 2023).

Os plasmídeos são pequenas moléculas presentes nas bactérias, de formato circular, cuja função natural é conferir características seletivas, a exemplo da resistência a antibióticos à célula hospedeira, essa é uma das características que os tornam extremamente úteis como vetores de clonagem. Além disso, no interior

da célula, os plasmídeos podem estar presentes como cópia única ou múltipla e se replicarem independentemente do DNA bacteriano, utilizando a maquinaria de replicação do hospedeiro (Mierendorf *et al.* 1998; Weil, 2018).

Os plasmídeos são muito comumente usados como vetores no campo da engenharia genética para clonagem e expressão de genes desejados. Vários tipos de plasmídeos já estão disponíveis comercialmente para clonagem e expressão de genes diferentes em um determinado hospedeiro. Para fins de clonagem, os plasmídeos são projetados para conter um sítio, conhecido como sítio de múltipla clonagem, que permite a inserção de genes heterólogos (Al Doghaither; Gull, 2019; Al-Hejin *et al.* 2019).

O sistema pET é amplamente reconhecido como o método mais prevalente para a produção de proteínas recombinantes (Mohammadzade *et al.*, 2015). No banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), que contém informações sobre proteínas com estruturas cristalográficas definidas, mais de 90% delas são produzidas utilizando o sistema pET (Sorensen; Mortensen, 2005). Dentro desta categoria de sistemas, destacam-se os plasmídeos pET32a e pET28a.

O pET28a se destaca como o vetor mais amplamente utilizado e é encontrado em grande parte dos estudos que envolvem clonagem e expressão de proteínas. Contém aproximadamente 5.400 pares de bases e sua estrutura geral inclui o promotor T7, juntamente com uma sequência operadora lac adjacente. Além disso, o plasmídeo contém um gene de resistência à canamicina, o que confere vantagens na seleção de células hospedeiras, e ainda possui um sítio de múltipla clonagem (Shilling *et al.* 2020).

A presença do promotor T7 e do operador lac permite a regulação precisa da expressão da proteína alvo, enquanto o gene de resistência à canamicina facilita a seleção e manutenção de plasmídeos nas células hospedeiras. O sítio de múltipla clonagem oferece flexibilidade na inserção do gene de interesse (Pouresmaeil; Azizi-Dargahlou, 2023). Todas essas características fazem do pET28a um vetor essencial para pesquisadores que trabalham com expressão de proteínas recombinantes.

Essa ampla utilização do pET28a reflete sua eficácia e versatilidade na expressão de proteínas recombinantes, tornando-o uma escolha confiável em muitos estudos de biologia molecular e biotecnologia.

O plasmídeo pET32a, possui um comprimento de 5.900 pares de bases. Esse plasmídeo é projetado para a expressão de proteínas fundidas com tioredoxina, a qual consiste em uma sequência de 109 resíduos de aminoácidos. Conforme relata Zhan *et al.* (2003), a fusão de proteínas com a tioredoxina (TrxA) proporciona vantagens substanciais na expressão e purificação de proteínas recombinantes, onde a TrxA contribui para a obtenção de proteínas solúveis e funcionalmente ativas, minimizando a formação de agregados que podem comprometer a eficácia do experimento.

Além disso, o pET32a inclui um gene que confere resistência à ampicilina, o que permite a seleção efetiva de células bacterianas transformadas com este plasmídeo, o promotor T7, o qual é induzível pela adição do IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo), um sítio de múltipla clonagem, proporcionando a inserção do gene de interesse, característica necessária para produzir o plasmídeo de acordo com as necessidades específicas (Wong, 2005).

Adicionalmente, o pET32a possui duas caudas de histidina, o que possibilita a clonagem na região C ou N-terminal da proteína de interesse. Essas caudas de histidina têm relevância na purificação da proteína através de técnicas de cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

Em conjunto, as características do plasmídeo pET32a o tornam uma ferramenta importante para a expressão de proteínas recombinantes e sua subsequente purificação e aplicação.

13 VANTAGENS DAS CELULASES RECOMBINANTES NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Considerando os desafios enfrentados mundialmente no que se refere aos preços dos combustíveis fósseis e às questões ambientais, as celulases ganharam grande importância, em função da propriedade das celulases na despolimerização da celulose, desempenhando um papel significativo na produção sustentável de biocombustíveis (Gan; Taylor, 2003; Juturu; Wu, 2014; Kumar; Singh; Singh, 2008; Pirzadah *et al.* 2017)

Neste sentido, a despolimerização enzimática da celulose pela ação das celulases, conforme citado anteriormente, é considerada uma estratégia ecologicamente correta, onde essas enzimas hidrolisam a celulose em condições

amenas sem gerar subprodutos. No entanto, o baixo rendimento dessas enzimas para a hidrólise desse polissacarídeo tem sido apontado como um dos gargalos para a comercialização da produção dos biocombustíveis (Alriksson *et al.* 2009; Juturu; Wu, 2014)

A produção de celulasas para aplicação na biomassa lignocelulósica é realizada usando diferentes tecnologias, considerando que, cada método tem suas próprias limitações. Considerando essas limitações, a tecnologia recombinante pode desempenhar uma função valiosa no aumento da produção de celulase além de melhorar a atividade e a eficiência e cooperação sinérgica dessas enzimas (Ali, *et al.* 2015; Bansal, *et al.* 2012; Fang; Xia, 2015; Singh, *et al.* 2019)

Alguns exemplos são brevemente apresentados demonstrando o valor e o potencial da produção recombinante na melhoria das enzimas lignocelulolíticas.

Aqeel *et al.* (2024), clonaram um gene da celobiohidrolase (CbCBH) da bactéria termofílica *Caldicellulosiruptor bescii* e expressaram em *Escherichia coli* (BL21), apresentando atividade 167,93 U/mg a 65 °C e pH 6,0, indicando que o CbCBH recombinante tem um potencial promissor para o setor de biocombustíveis.

Fang e Xia (2015), constataram um aumento significativo da atividade enzimática de uma celobiohidrolase recombinante associada a otimização de processos fermentativos, resultando em uma hidrólise mais eficiente. Ma *et al.* (2011), relataram uma melhoria da atividade de 6 a 8 vezes, de um gene da beta-glicosidase de *Penicillium decumbens* pela expressão heteróloga em *Trichoderma reesei*.

Zafar *et al.* (2014), expressaram e caracterizam uma endoglucanase recombinante de *Bacillus subtilis* em *Escherichia coli* e verificaram uma atividade significativamente maior do que a do tipo selvagem, indicando que a enzima recombinante tem potencial para muitas aplicações industriais envolvendo conversões de biomassa.

Lam *et al.* (1997), investigaram a produção extracelular de uma exoglucanase de *Cellulomonas fimi* em *E. coli*, onde foi verificado uma atividade específica aumentada

Com base nessas informações, podemos concluir que a tecnologia recombinante pode ajudar a produzir celulasas com maiores rendimentos que aquelas produzidas com microrganismos selvagens e, assim, promover mais

eficiência na conversão de biomassa celulósica em glicose e outros produtos. Além disso, colabora favorecendo à produção de celulasas para vários objetivos bem como melhorar a disponibilidade de biocombustível.

14 CONCLUSÃO

O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis, pode ser feita pela utilização de microrganismos produtores de celulase, principalmente os fungos. Além das cepas fúngicas naturais, algumas estratégias têm impulsionado a possibilidade de produção e utilização dessa enzima em escala industrial, a exemplo da engenharia genética.

A literatura destaca que a produção de proteínas recombinantes está ganhando evidência devido ao alto rendimento e controle de processo eficiente.

O conjunto de desenvolvimentos recentes para a produção heteróloga de proteínas em sistemas de expressão utilizando *Escherichia coli*, levou a uma capacidade melhorada de acumular proteínas, sobretudo na forma solúvel.

Esses avanços consolidaram a *E. coli* como um dos hospedeiros mais requeridos para produção de proteína recombinante.

A utilização da *E. coli* para expressão de enzimas, a exemplo das celulasas, é considerada uma alternativa promissora, permitindo a produção dessas enzimas para fins industriais, devido ao fato de ser uma alternativa mais rápida, além de aprestar uma rápida taxa de crescimento, tornando uma opção viável para a aplicação dessas celulasas.

Enzimas, sobretudo as celulasas, têm aplicações biotecnológicas potenciais nos diferentes ramos industriais, incluindo papel, detergente, alimentos, indústria têxtil, dentre outras.

Uma aplicação promissora das celulasas atualmente é no tratamento de biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol, sendo considerado um grande passo para o desenvolvimento de um processo economicamente viável e sustentável no cenário atual da indústria de biocombustíveis proveniente de materiais lignocelulósicos.

Fungos filamentosos têm sido predominantemente explorados para produção de enzimas celulolíticas utilizando substratos de baixo valor, considerado um grande passo para o desenvolvimento de um processo viável e sustentável no cenário atual da indústria de biocombustíveis proveniente de materiais lignocelulósicos.

Contudo, embora muitas pesquisas tenham sido conduzidas sobre celulasas de fungos filamentosos nos últimos anos, muitos trabalhos ainda precisam ser otimizados para a produção efetiva de celulase com alta eficiência de degradação para promover a aplicação comercial.

Referências

- ABOLORE, R. S.; JAISWAL, S.; JAISWAL, A. K. Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 7, p. 100396, 2024.
- AIN, Q. UI *et al.* Production, Purification and Characterization of Endoglucanase from Locally Isolated *Aspergillus flavus*: Production of Endoglucanase by *Aspergillus flavus*. **Biological Sciences-PJSIR**, v. 65, n. 3, p. 235-245, 2022.
- AL DOGHAITHER, H.; GULL, M. Plasmids as genetic tools and their applications in ecology and evolution. In: **Plasmid**. IntechOpen, 2019.
- ALARJANI, K. M. *et al.* Valorization of Date Molasses and Municipal Solid Waste for the Production of Cellulases by *Trichoderma reesei* Al-K1 149 in a Tray Reactor. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, n. 10, p. 5833-5842, 2024.
- ALBERTI, F.; FOSTER, G. D.; BAILEY, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 493-500, 2017.
- AL-HEJIN, A. M.; BORA, R. S.; AHMED, M. M. M. Plasmids for optimizing expression of recombinant proteins in *E. coli*. **Plasmid**, v. 13, p. 40-60, 2019.
- ALI, N. *et al.* Heterogeneous expression and functional characterization of cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger* for enzymatic hydrolysis of alkali pretreated bamboo biomass. **Molecular biotechnology**, v. 57, p. 859-867, 2015.
- ALMEIDA, L. E. da S.; RIBEIRO, G. C. A.; APARECIDA DE ASSIS, S.. β -Glucosidase produced by *Moniliophthora perniciosa*: Characterization and application in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 963-973, 2022.
- ALRIKSSON, B. *et al.* Produção de celulase a partir de hidrolisados de lignocelulose usados por *Aspergillus niger* recombinante. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2366-2374, 2009.
- AMENGUAL, N. G. *et al.* Expression and characterization of a family 45 glycosyl hydrolase from *Fomitopsis pinicola* and comparison to *Phanerochaete chrysosporium* Cel45A. **Enzyme and microbial technology**, v. 156, p. 110000, 2022.
- ANUPMA, A.; TAMANG, J. P. Diversity of filamentous fungi isolated from some amylase and alcohol-producing starters of India. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 905, 2020.
- AQEEL, A. *et al.* Cloning, expression and purification of cellobiohydrolase gene from *Caldicellulosiruptor bescii* for efficient saccharification of plant biomass. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 271, p. 132525, 2024

AREESHI, M. Y. Microbial cellulase production using fruit wastes and its applications in biofuels production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 378, p. 109814, 2022

ARTERO, A. S. *et al.* Spatial genetic structure and dispersal of the cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* in the Brazilian Amazon. **Plant Pathology**, v. 66, n. 6, p. 912-923, 2017.

AUHING ARCOS, J. A. *et al.* Biodiversity of ecotypes and aggressiveness ranges of *Moniliophthora perniciosa*, in *Theobroma cacao* L. national of the Ecuadorian Coast. **Scientia Agropecuaria**. V. 12, p. 599-609, 2021.

BANSAL, N. *et al.* Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste management**, v. 32, n. 7, p. 1341-1346, 2012.

BANU, J. R. *et al.* Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. **Fuel**, v. 302, p. 121086, 2021.

BARSOTTINI, M. R. O. *et al.* Biochemical characterization and inhibition of the alternative oxidase enzyme from the fungal phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Communications biology**, v. 3, n. 1, p. 263, 2020.

BARUAH, J. *et al.* Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, p. 141, 2018.

BARZEGAR, H. *et al.* Recombinant expression and characterization of endoglucanase isolated from Iranian *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 8, n. 2, p. 133-140, 2021.

BENITO, M. *et al.* Cloning, expression, and one-step purification/immobilization of two carbohydrate-binding module-tagged alcohol dehydrogenases. **Journal of biological engineering**, 2022, 16.1: 1-14.

BHATI, N.; SHREYA; SHARMA, A. K. Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, n. 2, p. e13623, 2021

BHATIA, S. K. *et al.* Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource technology**, v. 300, p. 122724, 2020.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. State-of-the-art strategies and applied perspectives of enzyme biocatalysis in food sector—current status and future trends. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 12, p. 2052-2066, 2020

BISWAS, R. *et al.* Sugar production from hybrid poplar sawdust: optimization of enzymatic hydrolysis and wet explosion pretreatment. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3396, 2020.

BOWERS, J. H. *et al.* The impact of plant diseases on world chocolate production. **Plant Health Progress**, v. 2, n. 1, p. 12, 2001.

BUSSLER, L. *et al.* Recombinant cellulase of *Caulobacter crescentus*: potential applications for biofuels and textile industries. **Cellulose**, v. 28, p. 2813-2832, 2021

CAIRNS, T. C. *et al.* Turning inside out: filamentous fungal secretion and its applications in biotechnology, agriculture, and the clinic. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 535, 2021.

CALIFANO, V.; COSTANTINI, A. Immobilization of cellulolytic enzymes in mesostructured silica materials. **Catalysts**, v. 10, n. 6, p. 706, 2020.

CANTAREL, B. L. *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_1, p. D233-D238, 2009.

CARVAJAL-RIVERA, A. S. *et al.* Temporal dynamics of witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*) in six cocoa clones with and without shading. **Journal of Plant Pathology**, p. 1-12, 2021.

CARVALHO, H. A. S. *et al.* Activity of polygalacturonases from *Moniliophthora perniciosa* depends on fungus culture conditions and is enhanced by *Theobroma cacao* extracts. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 83, p. 40-50, 2013.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHAHAL, D. S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 205-210, 1985.

CHEN, Y. *et al.* cAMP activates calcium signalling via phospholipase C to regulate cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, p. 1-13, 2021.

CHETTY, B. J. *et al.* Improvement of cell-tethered cellulase activity in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 18, p. 6347-6361, 2022.

CHETTY, B. J. *et al.* Improvement of cell-tethered cellulase activity in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 18, p. 6347-6361, 2022

CHOUDHURY, S. R.; DAS, A.; CHAKRABORTY, R. Review on progress in cellulase catalyzed saccharification of agricultural lignocellulosic biomass towards fermentable sugar and bioethanol: Kinetics & reactor configurations. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 103142, 2024.

CIPOLATTI, E. P. *et al.* Enzymes in green chemistry: the state of the art in chemical transformations. **Advances in enzyme technology**, p. 137-151, 2019.

COSTA, J. L. *et al.* *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao, interferes with cytokinin metabolism during infection of Micro-Tom tomato and promotes symptom development. **New Phytologist**, v. 231, n. 1, p. 365-381, 2021.

CRONAN, J. E. *Escherichia coli* as an Experimental Organism. **eLS**, 2014.

DADWAL, A. ; SHARMA, S.; SATYANARAYANA, T. Recombinant cellobiohydrolase of *Myceliophthora thermophila*: characterization and applicability in cellulose saccharification. **Amb Express**, v. 11, p. 1-15, 2021.

DAVISON, S. A.; DEN HAAN, R.; VAN ZYL, W. H. Exploiting strain diversity and rational engineering strategies to enhance recombinant cellulase secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 5163-5184, 2020.

DE ALMEIDA, P. Z. *et al.* Heterologous production and biochemical characterization of a new highly glucose tolerant GH1 β -glucosidase from *Anoxybacillus thermaurum*. **Process Biochemistry**, v. 99, p. 1-8, 2020.

DE SOUZA, T. S. P; KAWAGUTI, H. Y. Cellulases, hemicellulases, and pectinases: Applications in the food and beverage industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 8, p. 1446-1477, 2021.

DECHELLIS, A. *et al.* Supercharging carbohydrate binding module alone enhances endocellulase thermostability, binding, and activity on cellulosic biomass. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 12, n. 9, p. 3500-3516, 2024

DEVI, A. *et al.* Lignocellulosic biomass valorization for bioethanol production: a circular bioeconomy approach. **Bioenergy Research**, v. 15, n. 4, p. 1820-1841, 2022.

DHAR, H.; KASANA, R. C.; GULATI, A. Heterologous expression and characterization of detergent stable endoglucanase EG5B from *Paenibacillus* sp. IHB B 3084. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 9-15, 2015.

DUTTA, T. *et al.* Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 275-282, 2008.

ESCUDE-RODRÍGUEZ, J.-J. *et al.* Characterization of a novel thermophilic metagenomic GH5 endoglucanase heterologously expressed in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 15, n. 1, p. 76, 2022.

EIJSINK, V. G. H *et al.* On the functional characterization of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). **Biotechnology for biofuels**, v. 12, p. 1-16, 2019.

FALAK, S.; SAJED, M.; RASHID, N. Strategies to enhance soluble production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Biologia**, v. 77, n. 3, p. 893-905, 2022.

FANG, H.; XIA, L. Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. **Fuel**, v. 143, p. 211-216, 2015.

FARINAS, C. S.; BARBOZA, D. C. Fungos filamentosos de interesse em agroenergia: avaliação de diferentes metodologias de preservação do fungo *Aspergillus niger*. 2012.

FERRAZ, P. *et al.* Moniliophthora perniciosa, the causal agent of cacao witches' broom disease is killed in vitro by *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* yeasts. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 706675, 2021.

FERREIRA, J. A.; VARJANI, S.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on the ubiquitous role of filamentous fungi in pollution mitigation. **Current Pollution Reports**, v. 6, p. 295-309, 2020.

FERREIRA, R. da G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S.. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, p. 1-13, 2018.

FERREIRA, R. G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S. On the production cost of lignocellulose-degrading enzymes. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 1, p. 85-99, 2021.

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

GAN, Q.; TAYLOR, G. Dinâmica cinética na hidrólise enzimática heterogênea de celulose: uma visão geral, um estudo experimental e modelagem matemática. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1003-1018, 2003.

GARCIA, O. *et al.* Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **mycological research**, v. 111, n. 4, p. 443-455, 2007.

GEDDES, C. C.; NIEVES, I. U.; INGRAM, L. O. Advances in ethanol production. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 312-319, 2011.

GIOVANNONI, M. *et al.* Industrial use of cell wall degrading enzymes: the fine line between production strategy and economic feasibility. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 356, 2020.

GIWA, A. S.; ALI, N.; AKHTER, M. S. Cellulose Degradation Enzymes in Filamentous Fungi, A Bioprocessing Approach Towards Biorefinery. **Molecular Biotechnology**, p. 1-15, 2023.

GMOSER, R. *et al.* Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal biology and biotechnology**, v. 4, p. 1-25, 2017.

GOMES, A. R. *et al.* An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 4, n. 7, p. 346-356, 2016.

GOMES, D. S. *et al.* Identification of a key protein set involved in *Moniliophthora perniciosa* necrotrophic mycelium and basidiocarp development. **Fungal Genetics and Biology**, v. 157, p. 103635, 2021.

GRIFFITH, G. W., and J. N. Hedger. "The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*." **Heredity** **72**, no. 3, p. 278-289, 1994.

GUEDES, C. E. S. *et al.* Enzyme activity of cellulases produced by *Moniliophthora perniciosa*, the causing factor of "witch-broom" in cacao plants. **MAGISTRA**, v. 26, n. 4, p. 545–553-545–553, 2014.

GUERRAND, D. Economics of food and feed enzymes: Status and perspectives. In: **Enzymes in human and animal nutrition**. Academic Press, 2018. p. 487-514

HAO, S., Liu, Y., Qin, Y. *et al.* Expression of a highly active β -glucosidase from *Aspergillus niger* AS3.4523 in *Escherichia coli* and its application in gardenia blue preparation. **Ann Microbiol** v. 70, p. 32, 2020.

HASSAN, A. *et al.* Enhanced bioremediation of heavy metal contaminated landfill soil using filamentous fungi consortia: a demonstration of bioaugmentation potential. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, p. 1-20, 2019.

HE, R. *et al.* Ultra-high-throughput picoliter-droplet microfluidics screening of the industrial cellulase-producing filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 11, p. 1603-1610, 2019.

HU, X. *et al.* Optimized soluble expression of a novel endoglucanase from *Burkholderia pyrrocinia* in *Escherichia coli*. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-20, 2020.

HUANG, C. *et al.* Production, immobilization and characterization of beta-glucosidase for application in cellulose degradation from a novel *Aspergillus versicolor*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 437-446, 2021.

HUANG, R. *et al.* Characterization of the β -Glucosidase activity in indigenous yeast isolated from wine regions in China. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 6, p. 2327-2345, 2021.

HÜTTNER, S. *et al.* Recent advances in the intellectual property landscape of filamentous fungi. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 16, 2020.

IKEDA, Y. *et al.* Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 2, p. 333-338, 2007.

INOKUMA, K. *et al.* Direct production of 4-hydroxybenzoic acid from cellulose using cellulase-displaying *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 120, n. 4, p. 1097-1107, 2023.

JENSEN, M. B. *et al.* Cellulolytic and xylanolytic microbial communities associated with lignocellulose-rich wheat straw degradation in anaerobic digestion. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 645174, 2021.

JOSEPH, B. C. *et al.* An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J Cell Sci Ther**, v. 6, n. 5, p. 221, 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

KALRA, R.; CONLAN, X. A.; GOEL, M. Fungi as a potential source of pigments: harnessing filamentous fungi. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 369, 2020.

KAMAL, S. *et al.* Insights on heterologous expression of fungal cellulases in *Pichia pastoris*. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, p. 15-35, 2018.

KANNAN, P. *et al.* A review of applications of β -glucosidase in food, brewery, pharmaceutical and cosmetic industries. **Carbohydrate Research**, p. 108855, 2023.

KARAMI, F. *et al.* Fast, inexpensive purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* and improved catalytic/physicochemical properties upon the enzyme immobilization: Possible broad prospects for industrial applications. **Lwt,- Food Science and Technology** v. 118, p. 108770, 2020.

KARBOUNE, S.; GERAERT, P. -A.; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 3, p. 903-909, 2008.

KARNAOURI, A. *et al.* Recombinant expression of thermostable processive Mt EG5 endoglucanase and its synergism with Mt LPMO from *Myceliophthora thermophila* during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 1-17, 2017.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International journal of biological macromolecules**, v. 106, p. 803-822, 2018.

KHANANISHO, D. *et al.* Tips for efficiently maintaining pET expression plasmids. **Current genetics**, v. 69, n. 4, p. 277-287, 2023.

KIM, D.; KU, S. Bacillus cellulase molecular cloning, expression, and surface display on the outer membrane of *Escherichia coli*. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 503, 2018.

KIM, S.; Jeong, H.; Kim, E.Y.; Kim, J.F.; Lee, S.Y.; Yoon, S.H. Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21(DE3). **Nucleic Acids Res.** 2017

KOVÁCS, E. *et al.* Pretreatment of lignocellulosic biogas substrates by filamentous fungi. **Journal of biotechnology**, v. 360, p. 160-170, 2022.

KUBICEK, C. P.; KUBICEK, E. M. Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. **Current opinion in chemical biology**, v. 35, p. 51-57, 2016.

KÜES, U. Fungal enzymes for environmental management. **Current opinion in biotechnology**, v. 33, p. 268-278, 2015.

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

KUMAR, R.; SINGH, S.I; SINGH, O. V. Bioconversão de biomassa lignocelulósica: perspectivas bioquímicas e moleculares. **Journal of industrial microbiology and biotechnology** , v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

LAM, T.-L.; WONG, R. S. C; WONG, W.-K. R. Enhancement of extracellular production of a Cellulomonas fimi exoglucanase in *Escherichia coli* by the reduction of promoter strength. **Enzyme and microbial technology**, v. 20, n. 7, p. 482-488, 1997.

LAMBERTZ, C. *et al.* Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, p. 1-15, 2014.

LAN, T. Q. *et al.* Effect of lignin isolated from p-toluenesulfonic acid pretreatment liquid of sugarcane bagasse on enzymatic hydrolysis of cellulose and cellulase adsorption. **Industrial Crops and Products**, v. 155, p. 112768, 2020.

LI, J.-X.*et al.* Diversity of cellulase-producing filamentous fungi from tibet and transcriptomic analysis of a superior cellulase producer *Trichoderma harzianum* LZ117. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1617, 2020.

LI, J. *et al.* Increasing extracellular cellulase activity of the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by engineering cell wall-related proteins for improved consolidated processing of carbon neutral lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 365, p. 128132, 2022.

LIEW, K. J. *et al.* Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 115, p. 1094-1102, 2018.

LIU, G.; QU, Y. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: tools, recent advances and prospects. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 4, p. 519-529, 2019.

LIU, Z. *et al.* Improvement of ethanol production from crystalline cellulose via optimizing cellulase ratios in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 6, p. 1201-1207, 2017.

MA, L. *et al.* Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 366-371, 2011.

MADHAVAN, A. *et al.* Engineering interventions in industrial filamentous fungal cell factories for biomass valorization. **Bioresource technology**, v. 344, p. 126209, 2022.

MAFA, M. S. *et al.* Delineating functional properties of a cello-oligosaccharide and β -glucan specific cellobiohydrolase (GH5_38): Its synergism with Cel6A and Cel7A for β -(1, 3)-(1, 4)-glucan degradation. **Carbohydrate Research**, v. 495, p. 108081, 2020.

MAGALHÃES JR, A. I. *et al.* Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 6, p. 1505-1519, 2019.

MARES, J. H. *et al.* Hydrosoluble phylloplane components of *Theobroma cacao* modulate the metabolism of *Moniliophthora perniciosa* spores during germination. **Fungal biology**, v. 124, n. 1, p. 73-81, 2020.

MEINHARDT, L. W. *et al.* *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?. **Molecular plant pathology**, v. 9, n. 5, p. 577-588, 2008.

MIERENDORF, R. C. *et al.* Expression and purification of recombinant proteins using the pET system. **Molecular diagnosis of infectious diseases**, p. 257-292, 1998.

MIRET, J. *et al.* Development of a highly efficient production process for recombinant protein expression in *Escherichia coli* NEB10 β . **Biochemical engineering journal**, v. 159, p. 107612, 2020.

MOHAMMADZADE, H. *et al.* Cloning of Pituitary Gland Hormone in pET32a Expression Vector. **Journal Iran Clinic Res**, v. 2, n. 1, p. 58-61, 2015.

MOKALE KOGNOU, A. L. *et al.* Characterization of cellulose-degrading bacteria isolated from soil and the optimization of their culture conditions for cellulase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 11, p. 5060-5082, 2022.

MORÃO, L. G. *et al.* A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. **Plos one**, v. 17, n. 7, p. e0271403, 2022.

MOREAU, C. *et al.* Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, p. 1-13, 2019.

MÓZSIK, L. *et al.* Modular synthetic biology toolkit for filamentous fungi. **ACS Synthetic Biology**, v. 10, n. 11, p. 2850-2861, 2021.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. **Biodiversity and conservation**, v. 16, p. 1-5, 2007.

NAHER, L. *et al.* Cellulase enzyme production from filamentous fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in submerged fermentation with rice straw. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 868, 2021.

NAKAMURA, A. *et al.* Domain architecture divergence leads to functional divergence in binding and catalytic domains of bacterial and fungal cellobiohydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 43, p. 14606-14617, 2020.

NAKAZAWA, H. *et al.* Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, p. 681-689, 2008.

NARISSETTY, V. *et al.* An overview of cellulase immobilization strategies for biofuel production. **BioEnergy Research**, v. 16, n. 1, p. 4-15, 2023.

NIGAM, D.; ASTHANA, M.; KUMAR, A. *Penicillium*: a fungus in the wine and beer industries. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2018. p. 187-200.

OH, E. J.; JIN, Y.-S. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. **FEMS yeast research**, v. 20, n. 1, p. foz089, 2020.

OKOLIE, J. A. *et al.* Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 2145-2169, 2021.

ONUMA, H. *et al.* Purification and characterization of a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from *Tricholoma matsutake* grown on barley based solid-state medium. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 128, n. 6, p. 669-676, 2019.

OUYANG, J. *et al.* A complete protein pattern of cellulase and hemicellulase genes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 1, n. 11, p. 1266-1274, 2006.

PACHAURI, P. *et al.* Purification and characterization of cellulase from a novel isolate of *Trichoderma longibrachiatum*. **Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 85-91, 2020.

PACHECO, V. de S. M. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de celulases a partir de resíduos agroindustriais**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. 2016.

PAMPAÑAUPA, J. S. H. *et al.* Evaluación in vitro de 14 medios de cultivo sobre el crecimiento micelial de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora. **TAYACAJA**, v. 4, n. 1, p. 168-179, 2021.

PARK, T. *et al.* Molecular cloning, purification, expression, and characterization of β -1, 4-endoglucanase gene (Cel5A) from *Eubacterium cellulosolvens* sp. isolated from *Holstein steers'* rumen. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 4, p. 607, 2018.

PASCHOAL, D. *et al.* Infection by *Moniliophthora perniciosa* reprograms tomato Micro-Tom physiology, establishes a sink, and increases secondary cell wall synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 11, p. 3651-3670, 2022.

PATEL, A.; SHAH, Amita R. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 6, n. 2, p. 108-128, 2021.

PATROCÍNIO, N. G. R. B. *et al.* Population structure and migration of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa* from cacao and cultivated and wild solanaceous hosts in southeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 6, p. 900-911, 2017.

PESSOA, V. A. *et al.* Endoglucanase production by *Trichoderma reesei* cultivated in solid state fermentation using lignocellulosic waste **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 105518-105533, 2021.

PIMENTEL, P. S. S. R. **Desenvolvimento de coquetéis enzimáticos a partir de diferentes fungos filamentosos e aplicação na hidrólise da biomassa lignocelulósica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 2019.

PIRZADAH, T. B. *et al.* Cellulases: Industrial Workhorse in Bioenergy Sector. **Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes**, p. 143-153, 2017.

POURESMAEIL, M.; AZIZI-DARGAHLLOU, S. Factors involved in heterologous expression of proteins in E. coli host. **Archives of microbiology**, v. 205, n. 5, p. 212, 2023.

PRASETYO, J. *et al.* Response of cellulase activity in pH-controlled cultures of the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 52-61, 2010.

PRIETO, A. *et al.* Fungal glycosyl hydrolases for sustainable plant biomass valorization: *Talaromyces amestolkiae* as a model fungus. **International Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 545-558, 2021.

RAZA, A. *et al.* Identification and functional characterization of a β -glucosidase from *Bacillus tequelensis* BD69 expressed in bacterial and yeast heterologous systems. **PeerJ**, v. 8, p. e8792, 2020.

RESENDE, M. L. V. *et al.* *Crinipellis pernicios*a from a new host *Heteropterys acutifolia* is pathogenic to cocoa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 88-91, 2000.

RINCONES, J. *et al.* Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicios*a from various plant hosts in South America. **mycological research**, v. 110, n. 7, p. 821-832, 2006.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. *et al.* Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 912-919, 2011.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, p. 337-353, 2015.

SAKEKAR, A. A.; GAIKWAD, S. R.; PUNEKAR, N. S. Protein expression and secretion by filamentous fungi. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 1, p. 5, 2021

SALGADO, J. C. S. *et al.* Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases—a review. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 704-713, 2018.

SANTANA, M. L. *et al.* Production and characterization of carboxymethylcellulase by submerged fermentation of *Moniliophthora pernicios*a. **Catalysis Research**, v. 3, n. 2, p. 1-21, 2023.

SATHE, S. S. *et al.* Heterologous expression and biochemical studies of a thermostable glucose tolerant β -glucosidase from *Methylococcus capsulatus* (bath strain). **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 805-812, 2017.

SCARCELLA, A. S. de A. *et al.* Holocellulase production by filamentous fungi: potential in the hydrolysis of energy cane and other sugarcane varieties. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-12, 2021.

SENA, K.; ALEMANN, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora pernicios*a in cacao. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1272-1281, 2014.

SHI, X. *et al.* High-level expression of recombinant thermostable β -glucosidase in *Escherichia coli* by regulating acetic acid. **Bioresource technology**, v. 241, p. 795-801, 2017.

SHILLING, P. J. *et al.* Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. **Communications biology**, v. 3, n. 1, p. 214, 2020.

SINGH, A. *et al.* An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, p. 100652, 2021.

SINGH, G. *et al.* Current advancements in recombinant technology for industrial production of cellulases: part-ii. **Approaches to Enhance Industrial Production of Fungal Cellulases**, p. 177-201, 2019.

SINGH, P.; KUMAR, S. Microbial enzyme in food biotechnology. In: **Enzymes in food biotechnology**. Academic Press, 2019. p. 19-28.

SINGH, T. *et al.* Integrated biohydrogen production via lignocellulosic waste: opportunity, challenges & future prospects. **Bioresource Technology**, v. 338, p. 125511, 2021.

SIQUEIRA, G. A.; DIAS, I. K. R.; ARANTES, V. Exploring the action of endoglucanases on bleached eucalyptus kraft pulp as potential catalyst for isolation of cellulose nanocrystals. **International journal of biological macromolecules**, v. 133, p. 1249-1259, 2019.

SORENSEN, A. *et al.* Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 612-631, 2013.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113-128, 2005.

SOUZA, F. H. M. *et al.* Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose-and xylose-stimulated β -glucosidase from *Humicola insolens* RP86. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 106, p. 1-10, 2014.

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

SRIVASTAVA, N. *et al.* Impact of nanomaterials on sustainable pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels production: An advanced approach. **Bioresource Technology**, v. 369, p. 128471, 2023.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Synthetic biology strategy for microbial cellulases: an overview. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 229-238, 2019.

STRONG, P. J. *et al.* Filamentous fungi for future functional food and feed. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 76, p. 102729, 2022.

SUKUMARAN, R. K. *et al.* Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, J. *et al.* Molecular cloning and bioinformatics analyses of a GH3 beta-glucosidase from *Auricularia heimuer*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 34, n. 1, p. 850-859, 2020.

TAIPAKOVA, S. *et al.* Cloning and expression of *Lentinula edodes* cellobiohydrolase gene in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. **Journal of Cell & Molecular Biology**, v. 9, n. 1, 2011.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. de T.; PEREIRA, G. A. G. Time for chocolate: current understanding and new perspectives on cacao witches' broom disease research. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005130, 2015.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, p. 211-222, 2006.

THORESEN, M. *et al.* Revisiting the phenomenon of cellulase action: Not all endo- and exo-cellulase interactions are synergistic. **Catalysts**, v. 11, n. 2, p. 170, 2021.

TRAN, T. N. A. *et al.* β -Glucosidase and Its Application in Bioconversion of Ginsenosides in *Panax ginseng*. **Bioengineering**, v. 10, n. 4, p. 484, 2023.

UCHIYAMA, T. *et al.* Lytic polysaccharide monooxygenase increases cellobiohydrolases activity by promoting decrystallization of cellulose surface. **Science advances**, v. 8, n. 51, p. eade5155, 2022.

VÁZQUEZ-ORTEGA, P. G. *et al.* Expression of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Escherichia coli* using a synthetic optimized gene and stability improvements by immobilization using magnetite nano-support. **Protein Expression and Purification**, v. 190, p. 106009, 2022.

VIEGAS, S. C. *et al.* Efeito da estabilidade aumentada do mRNA da penicilina amidase nos níveis de expressão proteica. **FEBS letters**, v. 579, n. 22, p. 5069-5073, 2005.

VITOR, A. B. *et al.* Cloning, heterologous expression and characterization of β -glucosidase deriving from *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime and Phillips Mora. **3 Biotech**, v. 14, n. 11, p. 287, 2024.

WAGNER, S. *et al.* Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 38, p. 14371-14376, 2008.

WANG, M. *et al.* Engineering All-Round Cellulase for Bioethanol Production. **ACS Synthetic Biology**, v. 12, n. 7, p. 2187-2197, 2023.

WANG, Q.; ZHONG, C.; XIAO, H. Genetic engineering of filamentous fungi for efficient protein expression and secretion. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 293, 2020.

WATTS, A. *et al.* Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and tools. **Meta Gene**, v. 29, p. 100899, 2021.

WEIL, P. A. Molecular genetics, recombinant DNA, & genomic technology. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA, editors. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 31st ed. New York: McGraw-Hill Education; 2018.

WIKANDARI, R.; HASNIAH, N.; TAHERZADEH, M. J. The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126531, 2022.

WONG, S. H. Cloning of flavin reductase into pET32a (+) expression vector lacking the thioredoxin A tag to study solubility of EDTA monooxygenase A in overexpression systems. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 8, p. 59-66, 2005.

WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current opinion in biotechnology**, v. 59, p. 65-70, 2019.

YILDIRIM, Z.; ÇELİK, E. Periplasmic and extracellular production of cellulase from recombinant *Escherichia coli* cells. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 319-324, 2017.

YOGALAKSHMI, K. N. *et al.* Lignocellulosic biomass-based pyrolysis: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 286, p. 131824, 2022.

ZAFAR, M. *et al.* Recombinant expression and characterization of a novel endoglucanase from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. **Molecular biology reports**, v. 41, p. 3295-3302, 2014.

ZANG, X. *et al.* The structural and functional contributions of β -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, p. 1-13, 2018.

ZENG, R. *et al.* Cloning a novel endo-1, 4- β -d-glucanase gene from *Trichoderma virens* and heterologous expression in *E. coli*. **Amb Express**, v. 6, p. 1-7, 2016.

ZHAN, J. *et al.* A fusion protein of conotoxin MVIIA and thioredoxin expressed in *Escherichia coli* has significant analgesic activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 311, n. 2, p. 495-500, 2003.

ZHANG, F.; ZHAO, X.; BAI, F. Improvement of cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30 by overexpression of a novel regulatory gene Trvib-1. **Bioresource technology**, v. 247, p. 676-683, 2018.

ZHANG, P. *et al.* Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103859, 2021.

ZHANG, T. *et al.* Regulating strategies for producing carbohydrate active enzymes by filamentous fungal cell factories. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 691, 2020.

ZHANG, Z. *et al.* Review of research progress on the production of cellulase from filamentous fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 134539, 2024.

ZHAO, J., SHI, D., YANG, S. *et al.* Identification of an intracellular β -glucosidase in *Aspergillus niger* with transglycosylation activity. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 104, p. 8367–8380, 2020.

CAPÍTULO II – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA ENDOGLUCANASE rGH45 DE *Moniliophthora perniciosa* EM CÉLULA DE *Escherichia coli*

Cleidineia Souza de Santana¹, Edjane Bastos Ferreira¹, Thaíse Rosa da Silva¹, Luiz Henrique Machado de Oliveira¹, Helio Mitoshi Kamida¹, Alice Carmo Oliveira¹, Humberto Fonseca de Freitas², Monaliza Macêdo Ferreira³, Carlos Priminho Pirovani³, Gildomar Lima Valasques Júnior⁴, Sandra Aparecida Assis², Raquel Guimarães Benevides⁵

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Feira de Santana, Bahia, Brasil

²Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Saúde, Feira de Santana, Bahia, Brasil

³Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus, Bahia, Brasil

⁴Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Química e Ciências Exatas, Jequié, Bahia, Brasil.

⁵Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, Ceará, Brasil

Resumo

As endoglucanases são enzimas pertencentes à família das glicosil hidrolases (GH) que atuam na degradação da celulose, especificamente em suas regiões amorfas, clivando ligações β -1,4-glicosídicas e gerando novos terminais acessíveis a outras enzimas celulolíticas. Embora essas enzimas sejam produzidas por diversos microrganismos, os fungos filamentosos são considerados os principais produtores naturais. Neste estudo, foi realizada pela primeira vez a produção recombinante de uma endoglucanase GH45 oriunda do fungo fitopatogênico *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauieiro, utilizando como sistema heterólogo a bactéria *Escherichia coli*. O gene da enzima, denominado EG45, foi inicialmente clonado no vetor pET28a e posteriormente no vetor pET32a, com códons otimizados para expressão em *E. coli*. A substituição para o vetor pET32a permitiu a obtenção bem-sucedida da proteína recombinante de fusão (pET32a-EG45), expressa na cepa *E. coli* Rosetta (DE3) após indução com IPTG a 37 °C por 4 horas. Uma banda correspondente ao peso molecular estimado (~38 kDa) foi observada em gel SDS-PAGE, tanto na fração insolúvel quanto na fração solúvel. A purificação da proteína a partir da fração insolúvel resultou em elevado grau de pureza, mas baixa concentração final, inviabilizando a detecção da atividade enzimática. Em contraste, a proteína purificada da fração solúvel apresentou rendimento e concentração adequados para caracterização funcional, demonstrando atividade enzimática ótima a 50 °C e pH 6,0. Estes resultados revelam, de forma inédita, que a endoglucanase de *M. perniciosa* pode ser expressa de forma funcional em sistema bacteriano, ampliando o conhecimento sobre as enzimas lignocelulolíticas de fungos patogênicos. Além disso, reforçam o

potencial desta enzima para aplicações biotecnológicas, sobretudo na valorização de resíduos agroindustriais e em processos sustentáveis de conversão da biomassa.

Palavras-chave: Celulase, expressão heteróloga, biomassa, fungo fitopatígeno

Abstract

Endoglucanases are enzymes belonging to the glycosyl hydrolases (GH) family that act in the degradation of cellulose, specifically in its amorphous regions, cleaving β -1,4-glycosidic bonds and generating new terminals accessible to other cellulolytic enzymes. Although these enzymes are produced by several microorganisms, filamentous fungi are considered the main natural producers. In this study, the recombinant production of an endoglucanase GH45 from the phytopathogenic fungus *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cocoa, was performed for the first time, using the bacterium *Escherichia coli* as a heterologous system. The enzyme gene, called EG45, was initially cloned in the pET28a vector and later in the pET32a vector, with codons optimized for expression in *E. coli*. The replacement of the pET32a vector allowed the successful production of the recombinant fusion protein (pET32a-EG45), expressed in the *E. coli* Rosetta (DE3) strain after induction with IPTG at 37 °C for 4 h. A band corresponding to the estimated molecular weight (~38 kDa) was observed on SDS-PAGE gels in both the insoluble and soluble fractions. Protein purification from the insoluble fraction resulted in a high degree of purity but a low final concentration, making it impossible to detect enzymatic activity. In contrast, the protein purified from the soluble fraction showed adequate yield and concentration for functional characterization, demonstrating optimal enzymatic activity at 50 °C and pH 6.0. These results reveal, for the first time, that the endoglucanase of *M. perniciosa* can be functionally expressed in a bacterial system, expanding the knowledge about lignocellulolytic enzymes of pathogenic fungi. Furthermore, they reinforce the potential of this enzyme for biotechnological applications, especially in the valorization of agro-industrial waste and in sustainable biomass conversion processes.

Keywords: Cellulase, heterologous expression, biomass, fungus

1 INTRODUÇÃO

O advento dos sistemas de expressão de proteínas heterólogas é considerado um importante avanço para a biotecnologia no decorrer do último século. Esses sistemas são proteínas codificadas em DNA recombinante e expressas em um hospedeiro. Essa evolução possibilitou um aumento na produção de proteínas recombinantes, permitindo a produção de quantidades substanciais, bem como ampliando o escopo do uso para distintos setores industriais (Brabander *et al.* 2023; Eskandari, *et al.* 2024; Pouresmaei; Azizi-Dargahlou, 2023).

A seleção de um hospedeiro para expressão de genes heterólogos corresponde a uma importante etapa no processo de obtenção de produtos provenientes de novas combinações de material genéticos de organismos distintos. Existem muitos organismos, procariotos e eucariotos, utilizados como hospedeiros para produção heteróloga, a exemplo de bactérias, leveduras, fungos, insetos, plantas e animais (Brondyk, 2009; Demain; Vaishnav, 2009; Gomes, *et al.* 2016; Overton, 2014; Vieira Gomes, 2018; Ward, 2012).

No grupo das bactérias, a *Escherichia coli* tem sido, por mais de duas décadas, o meio mais popular de produção de proteínas recombinantes. Essa preferência reside no seu rápido crescimento, bem como por serem altamente eficientes para incorporar DNA exógeno e expressar proteínas recombinantes com alto rendimento (Kaur; Kumar; Kaur, 2018; Morão, *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2022).

A utilização de *Escherichia coli* para produção de celulasas recombinantes tem sido amplamente descrita. As celulasas catalisam as reações de hidrólise da celulose, quebrando ligações β -(1,4)-glicosídicas, para produzir glicose. Essas enzimas são bastante requeridas, uma vez que, a glicose obtida pode ser processada posteriormente em bioetanol e outros produtos valiosos, conferindo a essas enzimas grande potencial para aplicações industriais (Ferreira, Azzoni, Freitas, 2018; Garvey, *et al.* 2013; Li *et al.* 2025).

Com o crescente mercado mundial para a produção de biocombustíveis, a demanda por celulase aumentou significativamente. O método convencional para produzir celulase consiste em usar fungos filamentosos, que são os principais produtores de enzimas hidrolíticas. Os gêneros *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e *Neurospora* sp. tem sido o grupo de fungos mais bem descritos como ótimos

produtores de celulases (Amraini, *et al.* 2017; Bhati, *et al.* 2021; Jain; Agrawal, 2020; Sutaoney, *et al.* 2024).

Além desses gêneros, um fungo que tem chamado à atenção pela sua característica fitopatogênica e que já foi descrito como produtor do complexo celulolítico é o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Almeida; Ribeiro; Assis, 2022; Santana, 2010; De Santana, *et al.* 2023; Vitor *et al.* 2024).

O fungo *Moniliophthora perniciosa* é um fitopatógeno mundialmente reconhecido que infecta o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). Sua capacidade de atravessar a parede celular vegetal torna o fungo um conhecido produtor de enzimas celulolíticas, as quais são responsáveis por atuar na degradação da celulose, principal componente da parede celular vegetal.

Apesar de seu potencial enzimático significativo, *M. perniciosa* é pouco explorado como fonte de biocatalisadores, principalmente devido à sua natureza patogênica, à dificuldade de cultivo em condições seguras e controladas e à necessidade de contenção rigorosa para evitar riscos ambientais e agrícolas. Esse cenário limita o aproveitamento direto do fungo em aplicações industriais ou laboratoriais, gerando uma lacuna no uso de sua diversidade enzimática para fins biotecnológicos.

Nesse contexto, a expressão heteróloga surge como a estratégia mais segura e eficaz para explorar o repertório enzimático de *M. perniciosa*. Por meio da clonagem de genes de interesse e sua expressão em hospedeiros como *Escherichia coli*.

Dentre as enzimas produzidas por esse fungo, destacam-se endoglucanases, responsáveis por iniciar o processo de hidrólise ao clivar aleatoriamente as ligações do tipo β -1-4 presentes na fibra celulósica. Devido a essa característica, *M. perniciosa* é considerada uma importante candidata para a produção heteróloga de enzimas celulases, visando a sua aplicação para fins biotecnológicos (Dai, *et al.* 2023; Hirvonen; Papageorgiou, 2003).

Conforme descreve Silva *et al.* (2018), para que as endoglucanases possam ser aplicadas em contextos biotecnológicos, é necessário que apresentem certas características essenciais. Entre essas, destacam-se (1) a estabilidade térmica, que assegura sua funcionalidade em diferentes temperaturas; (2) a capacidade de realizar a hidrólise eficaz em uma ampla faixa de pH, conferindo-lhes versatilidade

de atuação em diferentes ambientes; e (3) a tolerância a sais e líquidos iônicos, o que garante sua eficácia mesmo em presença de substâncias que poderiam comprometer sua atividade enzimática.

Embora a produção recombinante da endoglucanase, com as características supracitas tenha sido alcançada em diferentes estudos, (Dhar, *et al.* 20015; VadalA *et al.* 2021; Zeng, *et. al.* 2016), até o momento, não existem registros para endoglucanase proveniente do fungo *M. pernicioso*, produzida de forma recombinantes em células de *E. coli*. confirmando o caráter inédito e inovador da presente pesquisa.

Dessa forma, este estudo contribui para o conjunto de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de métodos destinados ao isolamento, caracterização e aplicação de endoglucanases provenientes de fungos filamentosos, que têm integrado uma tendência global em constante crescimento, visando identificar endoglucanases com um notável potencial para aplicações biotecnológicas principalmente para aquelas que envolvem a utilização de biomassa lignocelulósica (Suwannarangsee, *et al.* 2012; Dos Santos *et al.* 2023).

Além disso, a utilização de um fungo fitopatogênico como fonte de enzimas representa uma estratégia inovadora, pois permite o reaproveitamento de organismos tradicionalmente estudados por seu impacto negativo na agricultura em processos industriais sustentáveis, promovendo o aproveitamento biotecnológico de sua maquinaria enzimática adaptada à degradação da parede celular vegetal.

Em trabalho anterior, desenvolvido por Santana (2020), foi possível detectar por análise do DNA complementar (cDNA) a expressão de uma proteína hipotética da família GH45 do fungo *M. pernicioso* envolvida na degradação de celulose utilizando como substrato resíduos celulolíticos. Portanto, buscar a produção dessa proteína de forma pura e ativa não apenas preenche essa lacuna, mas também representa um avanço significativo na produção de enzimas com potencial aplicação industrial.

Neste sentido, o presente trabalho objetiva a produção e caracterização de uma endoglucanase proveniente do fungo *Moniliophthora pernicioso*, através da clonagem e expressão do gene correspondente a enzima em células de *Escherichia coli* a fim de contribuir para a produção dessa enzima em larga escala e sua aplicação nos diversos setores industriais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANÁLISE *IN SILICO* DA ENDOGLUCANASE 45 (EG45)

A sequência completa dos resíduos de aminoácidos da endoglucanase 45 (EG45) do fungo *Moniliophthora perniciosa* foi obtida a partir do sequenciamento completo do genoma fungo, cedido pelo Professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica da UNICAMP.

O gene correspondente à EG45 foi obtido em estudo desenvolvido por Santana (2020), que detectou por análise de cDNA a expressão de uma proteína hipotética da família GH45 do fungo *M. perniciosa* envolvida da degradação de celulose, utilizando como substrato resíduos celulolíticos.

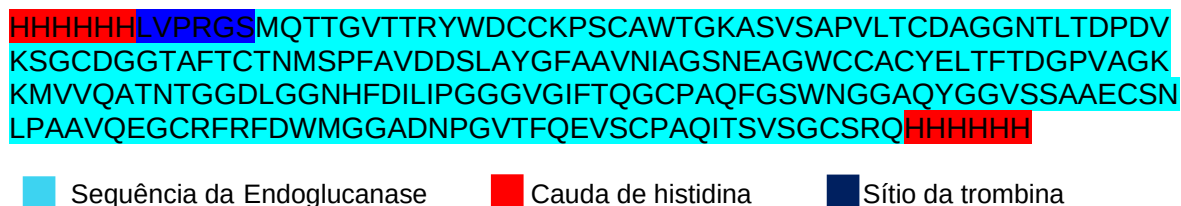
A sequência codificante para Endoglucanase 45 (EG45) foi então submetida ao servidor Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) a fim de estimar o ponto isoelétrico (pI) teórico, o peso molecular, o coeficiente de extinção e a estabilidade da proteína, a partir do índice de instabilidade.

2.1.2 Obtenção do plasmídeo recombinante

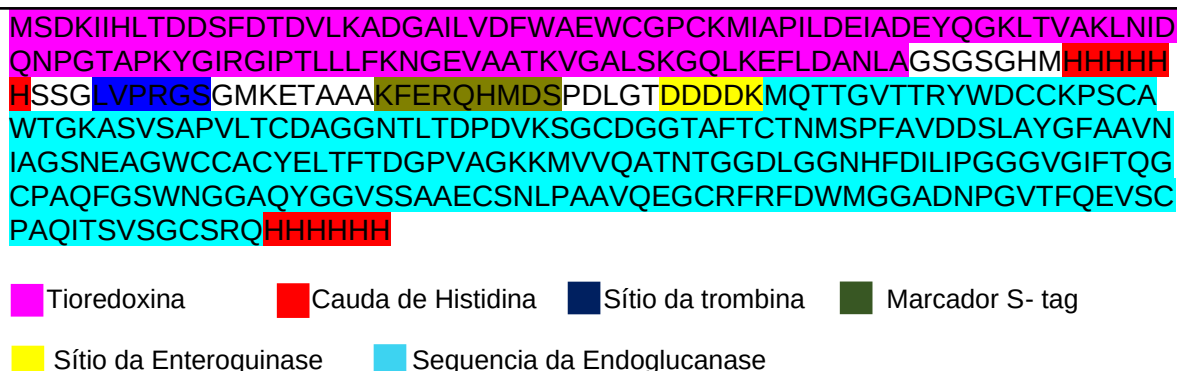
A sequência codificante da proteína EG45 com códons otimizados para expressão em bactéria, clonada nos sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* do vetor de clonagem pET28a e nos sítios de restrição *NcoI* e *HindIII* do vetor de clonagem pET- 32a, foram sintetizados pela empresa FastBio.

A construção em pET28a permite a expressão da proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidina e um sítio da trombina, conforme representada no Quadro 1. Enquanto a construção em pET32a visa a expressão da proteína recombinante fundida com 109 resíduos de aminoácidos da tioredoxina derivada do vetor, associada à cauda de histidina. Sendo assim, a construção proteica final é constituída pela tioredoxina (Trx), um sítio de clivagem da Trombina, um sítio de clivagem da Enteroquinase e pela cauda de histidina, conforme representada no Quadro 2.

Quadro 1: Construção pET28a-EG45



Quadro 2: Proteína de fusão pET32a-EG45



2.1.3 Transformação

Inicialmente os plasmídeos recombinantes foram solubilizados e estocados conforme instruções do fabricante, a saber, os tubos contendo os plasmídeos foram centrifugados a 6.000 $\times g$ por 1 minuto a 4 °C, em seguida, foi adicionado 20 μ L de água ultrapura para dissolver o DNA, logo depois o tubo foi agitado em vórtex por 1 minuto e mantidos a 4 °C para as etapas posteriores.

Os plasmídeos recombinantes pET28a-GH45 e pET32a-EG45 foram então transformados em células competentes de *E. coli*, na linhagem Rosetta (DE3) para pET28a-GH45 e Rosetta (DE3) e BL21 (pLysS) para pET32a-EG45, por meio da técnica de transformação por choque térmico, obedecendo as seguintes etapas: Inicialmente, foi adicionado 1 μ L (aproximadamente 30 ng) do DNA plasmidial recombinante pET-32a-EG45 e pET28a-EG45 em 200 μ L de células competentes Rosetta (DE3) e BL21 (pLysS), as quais estavam em estoque mantido a -80 °C e descongeladas em gelo. As células que receberam o plasmídeo foram mantidas em gelo por 20 minutos e em seguida foram submetidas a banho maria a 42 °C por 2 minutos, realizando-se dessa forma o choque térmico.

Posteriormente, foi adicionado 1 mL de caldo Luria-Bertani (LB) às amostras e incubadas por 1 hora a 37 °C em estufa bacteriológica. Decorrido o tempo, as células foram recuperadas por centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm em centrífuga *MinSpin Eppendorf*, o pellet formado foi ressuspendido em 200 µL de caldo LB, em seguida, foi inoculado em placa de petri, com auxílio de uma alça de Drigalski, contendo ágar LB, suplementado com os antibióticos adequados, (Ampicilina, 50 µg/mL e Cloranfenicol, 34 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica Lab Trade modelo EB-60, durante 16 horas a 37 °C.

2.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ENDOGLUCANASE 45 - rGH45

2.2.1 Expressão em pequena escala e verificação da solubilidade – ensaios preliminares

Após a transformação, uma unidade formadora de colônia (UFC) foi usada para inocular 3 mL de caldo LB suplementado com os antibióticos adequados, a saber: 50 µg/mL de Canamicina para pET28a-EG45 e 50 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol para o plasmídeo recombinante pET32a-EG45. Os tubos foram incubados sob agitação constante (180 RPM, a 37 °C por 12-16 horas) em incubadora Tecnal modelo TE-424.

Após esse período, as células foram recuperadas por centrifugação (centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R) a 3500 RPM por 3 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi ressuspendido em caldo LB e a cultura foi usada para inocular em 5 mL de caldo LB suplementado com os antibióticos adequados (Ampicilina 50 µg/mg e Cloranfenicol 34 µg/mL e Canamicina 50 µg/mL) sendo mantidos sob agitação de 180 RPM a 37 °C, até atingir a densidade ótica entre 0,6 e 0,8 no comprimento de onda de 600 nanômetros.

Ao atingir a densidade ótica desejada, foram feitos estoques da cultura. Para isso, foram coletadas alíquotas de aproximadamente 200 µL e adicionado glicerol 50%, sendo, em seguida, congelado rapidamente em nitrogênio líquido e estocado em ultra freezer a -80 °C.

Foram coletados ainda 1 mL de cada cultura para compor o controle não induzido (extrato total sem IPTG). A cultura restante foi induzida mediante a adição de isopropil-β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração de 0,4 mmol L⁻¹.

Após o período de 4 horas a 37 °C foi coletado uma alíquota de 1 mL para compor o controle positivo com indução por IPTG (extrato total com IPTG).

As amostras foram centrifugadas à 13.000 rpm por 2 minutos em Microcentrífuga MiniSpin®, o sobrenadante foi descartado e os pellets gerados foram ressuspensos em 400 µL de tampão de lise (*Binding Buffer* 1x composto de 0,4 mM de NaCl, 160 mM de TRIS-HCl e 40 mM de imidazol + lisozima 50 µg/mL), e a mistura incubada por 30 min a 30 °C.

Posteriormente, as amostras foram mantidas em banho de gelo e submetidas a lise mecânica em sonicador (Pgex 30), com pulsos de 8 segundos e intervalos de 20 segundos, com amplitude 70% utilizando sonda de 2 mm. Em seguida, foram coletados 30 µL da cultura lisada, sendo identificadas como extrato total sem IPTG e extrato total com IPTG; aos extratos foram adicionados 90 µL de água e 30 µL de tampão de amostra 5x (β -Mercaptoetanol 5 %, Tris-HCl 0,02mM pH 6,8, SDS 4 %, glicerol 27 %, azul de bromofenol 1 %).

Os 370 µL restantes foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos em Microcentrífuga MiniSpin® para separação das frações solúvel e insolúvel, sendo adicionado o tampão de amostra 5x, para visualização em SDS-PAGE 14% a fim de verificar expressão e solubilidade da proteína recombinante.

2.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Para preparação das amostras visando a visualização em gel SDS-PAGE, cada 20 µL de amostra específica foi acrescida de tampão de amostra 5X (β -Mercaptoetanol 5 %, Tris-HCl 0,02 mol L⁻¹ pH 6,8, SDS 4 %, glicerol 27 %, azul de bromofenol 1 %) correspondente a 20 % do volume de amostra. Posteriormente, foram desnaturadas a uma temperatura de 95 °C durante 10 min. Em seguida, foram submetidas a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 14% junto com o marcador de peso molecular de proteína (Low Molecular Weight Marker de 14-97 kDa - GE Healthcare), nas seguintes condições: 30 mA por 80 minutos em um sistema de eletroforese Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis Unit SE250 (Hoefer).

Após a conclusão da corrida, o gel foi imerso em uma solução de tampão de fixação composta por 40% de etanol e 10% de ácido acético, sendo mantido nessa

solução por 20 minutos. Em seguida, o gel foi submetido a um processo de coloração utilizando uma solução de Azul de Coomassie a 0,08%, e deixado sob agitação em mesa oscilante por um período de 24 horas.

Decorrido esse intervalo de tempo, o gel foi submetido a uma etapa de lavagem com água e, posteriormente, colocado novamente em mesa oscilante para permitir a descoloração adequada. Para a visualização das bandas de proteínas, o gel foi digitalizado utilizando um ImageScanner II (Amersham GE Healthcare).

2.2.3 Expressão da proteína recombinante em larga escala

A expressão da proteína em larga escala foi feita a partir da célula estocada em glicerol 50%. Para isso, foi coletado 3 μ L do estoque inoculado em 3 mL de meio de cultura caldo LB suplementado com os antibióticos Ampicilina 50 μ g/mL e cloranfenicol 34 μ g/mL, sendo esse o pré-inóculo.

O pré-inóculo foi então incubado a 37 °C, sob agitação de 180 rpm por 16 horas. No dia seguinte, a cultura celular foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sedimento celular foi inoculado em 100 mL de caldo LB suplementados com os mesmos antibióticos supracitados e mantidos sob agitação constante de 180 rpm a 37 °C, até atingir a densidade ótica entre 0,6 e 0,8 no comprimento de onda de 600 nm. Ao atingir a absorbância, foi adicionado IPTG na concentração de 0,4 mM, sendo incubada a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 4 horas para indução. Decorrido esse período, a cultura celular foi centrifugada a 3.000 rpm e a massa celular foi submetida ao processo de purificação.

2.2.4 Purificação da proteína EG45 recombinante

Para o processo de purificação, inicialmente, a massa celular foi ressuspensa em 10 mL de tampão de lise (*Binding Buffer* 1x constituído por Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 5 mM + lisozima 50 μ g mL⁻¹) e mantido por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi colocada em banho de gelo e submetida a lise mecânica com o processador Ultrassônico (Pgex 130) com sonda de 6 mm de diâmetro com ciclos de 10 pulsos e intervalo de 25 segundos de repouso no gelo para resfriamento, esse processo foi realizado por 20 minutos a 70% de amplitude.

Em seguida, o produto gerado foi centrifugado por 40 minutos à 9.500 rpm a 4 °C e o pellet formado, referente à fração insolúvel, foi armazenado a -20 °C, enquanto o sobrenadante correspondente à fração solúvel, foi coletado para purificação por cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel HisTrap HP (GeHealthcare) que foi anteriormente carregada com íons Ni^{2+} mediante protocolos e recomendações do fabricante.

O sobrenadante contendo a proteína recombinante foi aplicado à coluna de níquel HisTrap HP e eluída com tampão contendo concentrações variadas (50 a 500 mM) de imidazol. As amostras foram confirmadas em SDS-PAGE 14% corado com azul de Comassie coloidal.

As frações coletadas foram submetidas à diálise contra tampão Tris-HCl pH 7,0 para a dessalinização.

2.2.5 Purificação da fração insolúvel

Para purificação da fração insolúvel, inicialmente foi feita a solubilização do pellet com 40 mL do reagente *Binding Buffer* 1x com ureia 6 M. Sendo mantido em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período o material foi submetido a lise mecânica durante 10 minutos em uma amplitude de 70 % por 10 segundos contínuos e com intervalos de 25 segundos em repouso. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 20 minutos em rotação máxima de 15.000 rpm. Após a centrifugação, a etapa foi repetida por mais três vezes.

Ao final, o pellet produzido foi resuspendido em 50 mL da solução de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7 com glicerol 5% e ureia 6 M e teve sua suspensão sonicada por 10 minutos e centrifugada por 20 minutos. Por fim, o sobrenadante limpo contendo a proteína alvo foi dialisado para remover a ureia presente.

A diálise foi realizada pela redução da molaridade inicial da ureia 6 M por gradiente linear de concentração (4 M, 3 M, 2,5 M, 2 M, 1,5 M, 1 M, 0,5 M) pelo processo de retirada da solução de diálise e adição de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7 a cada três horas, totalizando aproximadamente 10 trocas de diálise e a renaturação proteica.

As amostras foram avaliadas em SDS-PAGE a 14 % corado com azul de Comassie coloidal, conforme descrito anteriormente.

2.2.6 Avaliação das condições de expressão solúvel da proteína recombinante - pET32a-GH45

A fim de obter a proteína na forma solúvel, uma unidade formadora de colônia (UFC) foi inoculada em 3 mL de caldo LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. Os tubos foram incubados sob agitação constante de 250 rpm em incubadora Combi – SV12, a 37 °C por 12-16 horas.

Após esse período, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos a 4 °C, o sedimento celular formado foi ressuscitado e a cultura foi inoculada em 50 mL de caldo LB suplementado com os antibióticos adequados (ampicilina 50 µg/mg e cloranfenicol 34 µg/mL) e mantidos sob agitação de 200 rpm a 37 °C, até atingir a densidade ótica entre 0,6 e 0,8 no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro Spectrum SP-2000UV.

Posteriormente, a cultura foi dividida em alíquotas de 2 mL, sendo adicionado em cada alíquota isopropil-β-D-thiogalactopiranosideo (IPTG), nas concentrações finais de 0,1 mM, 0,5 mM e 1,0 mM, uma alíquota sem adição de IPTG foi utilizada como controle não induzido. Em seguida, as alíquotas foram incubadas sob agitação de 180 rpm, em diferentes temperaturas e intervalos de tempo, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4: Concentrações de IPTG, intervalo de tempo e temperaturas utilizadas para o teste de expressão na forma solúvel para a construção pET32a-EG45 - Rosetta (DE3)

Concentração de IPTG	Temperatura °C			
	37	25	18	
0 mM	4 horas	12-16 horas	24 horas	48 horas
0,1 mM	4 horas	12-16 horas	24 horas	48 horas
0,5 mM	4 horas	12-16 horas	24 horas	48 horas
1,0 mM	4 horas	12-16 horas	24 horas	48 horas

Após cada período, as células foram recuperadas por centrifugação (centrífuga HT modelo MCD-2000) a 14.000 RPM por 3 minutos e ressuscitadas em 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 160 mM, NaCl 4 M e imidazol 40 mM e

lisozima 50 µg/mL). Em seguida foi realizada a lise mecânica utilizando sonicador Eco-sonics - Desruptor, sendo exposta a 15 ciclos de sonicação, por 10 segundos cada ciclo, com intervalo de 30 segundos e amplitude de 70%. Durante todo o processo a amostra foi mantida em gelo.

Ao final do processo, as células foram separadas por centrifugação em centrífuga HT modelo MCD-2000 a 14.000 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e em 20 µL do sobrenadante foram adicionados 20 µL de tampão (Tris-HCl 160mM pH 7,4; NaCl 4 M e imidazol 40 mM), 20 µL tampão de amostra (Tris-HCl 188 mM pH 6,8, Glicerol 15% (v/v), SDS 6% (p/v), azul de bromofenol 0,075% (p/v) e beta-mercaptoetanol 5% (v/v)), obedecendo uma proporção 1:1:1 (v/v). Ao sedimento foi adicionado 200 µL de NaOH 0,1M e em 40 µL desse sedimento foram adicionados 20 µL do tampão de amostra descrito acima, obedecendo uma proporção de 2:1.

Em seguida, as proteínas foram submetidas a desnaturação, aquecendo-se a solução a 95 °C por 10 minutos em termociclador GeneProe (BIOER®), e, posteriormente, submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE 14%.

Por fim, o gel foi descorado, conforme os seguintes passos: inicialmente o gel foi aquecido por 3 minutos, com intervalo de 30 segundos para eliminar todos os resíduos de SDS. Em seguida, substituiu-se a água por uma solução contendo azul de comassie-R, 0,005% (p/v) e ácido clorídrico 0,3% (v/v). O gel foi, então, submetido a 3 ciclos de aquecimento por 1 minuto. Após a visualização das bandas, o gel foi mantido em água destilada.

Após a constatação da expressão da proteína na forma solúvel, a partir da eletroforese em gel de SDS-PAGE 14%, foi feito um ensaio em larga escala seguindo as etapas descritas na sessão 4.2.3 e posteriormente a proteína expressa foi purificada seguindo as etapas da sessão 4.2.4.

A fração coletada foi submetida à diálise para dessalinização e concentrada em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0, utilizando filtro de ultrafiltração com tamanho de exclusão de 10kDa. Os procedimentos foram feitos conforme indicação do fabricante. Após a diálise, as amostras foram avaliadas em SDS PAGE 14% e corado com azul de Coomassie, segundo o protocolo descrito acima.

2.2.8 Ensaios de atividade da rGH45

2.2.8.1 Determinação da atividade da proteína purificada

Para confirmar se a proteína rGH45 estava na sua forma ativa, foi determinada a atividade de endoglucanase (CMCase), através da quantificação de açúcares redutores liberados, os quais são medidos por método colorimétrico empregando 3,5 ácido-di-nitro salicílico (DNS) como agente químico (MILLER, 1959). A glicose foi empregada como padrão para cálculo da concentração de açúcares redutores.

O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando carboximetilcelulose (CMC) a 0,5% como substrato, dissolvida em tampão citrato pH 4,8. Para a realização dos testes, foram preparadas três reações distintas: a reação de controle da enzima, composta por 0,25 mL da solução enzimática e 0,25 mL do tampão citrato pH 4,8; a reação de controle do substrato, contendo 0,25 mL da solução de CMC a 0,5% e 0,25 mL do tampão citrato; e o ensaio enzimático propriamente dito, formado pela mistura de 0,25 mL do substrato e 0,25 mL da enzima.

Todas as reações foram incubadas a 50 °C por 30 minutos. Decorrido o período, foi adicionado 0,5 mL de DNS. A reação novamente incubada por 15 minutos a 95 °C, após esse tempo a mistura foi resfriada em banho de gelo por 5 minutos, em seguida foi adicionado 2,5 mL de água para quantificação da absorção em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nanômetro para quantificação de açúcares redutores liberados pela ação da enzima sobre o substrato (CMC). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μ mol de açúcar redutor por minuto de reação nas condições de ensaio.

2.2.8.2 Determinação do teor de proteína total

A determinação da concentração da proteína total foi feita por meio do método de Bradford (1976). A curva de calibração padrão foi determinada utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA). A reação de determinação da concentração foi realizada empregando-se 100 μ L da proteína em 5 mL do reagente Bradford, sendo incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, em seguida a quantidade de proteínas foi determinada por leitura da absorbância no comprimento de onda de

595 nanômetros. Para o branco, foi utilizado 100 µL de água destilada em 5 mL do reagente Bradford.

2.2.8.3 Otimização de pH e temperatura ótimos

O efeito do pH e da temperatura para a atividade da endoglucanase foi estudado usando um planejamento experimental Doehlert para duas variáveis (Tabela 5). O pH foi estudado em 5 níveis (4 a 8, ponto central 6,0) utilizando tampão citrato-fosfato (pH 4, 5 e 6) e tampão fosfato (pH 7 e 8) conforme a tabela 5. A temperatura foi estudada em 3 níveis (30, 50 e 70°C, ponto central 50°C). Os resultados obtidos das atividades enzimáticas foram comparados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste F, utilizando-se o software Statistic 7.0. As análises das médias e desvios-padrão foram realizadas no Prism 5.0 e no Microsoft Office Excel.

Tabela 5: Planejamento experimental Doehlert utilizado para otimizar as condições ideais de pH e temperatura da endoglucanase recombinante do fungo *Moniliophthora perniciosa*.

Amostras	pH	Temperatura
1	5	70
2	7	70
3	4	50
4C	6	50
4C	6	50
4C	6	50
5	8	50
6	5	30
7	7	30

(C): Ponto central

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR rGH45

3.1.1 Análise *in silico* aponta endoglucanase 45 (EG45) de *M. perniciosa* como potencial celulase

A sequência correspondente a uma endoglucanase 45 (EG45) de *Moniliophthora perniciosa* foi obtida a partir do sequenciamento completo do genoma do fungo.

A seleção da sequência, síntese de cDNA, amplificação e sequenciamento do gene codificante para a endoglucanase 45 foi resultado de trabalho anterior desenvolvido por Santana (2020).

Nesse trabalho, também foi realizado uma análise estrutural da sequência proteica da endoglucanase do fungo *M. perniciosus*, no qual a determinação da estrutura tridimensional por meio de modelagem comparativa apresentou um modelo com alta qualidade, indicando a proteína como sendo uma boa candidata para expressão heteróloga, purificação e caracterização para futuras aplicações com fins biotecnológicos.

Os resultados das análises do servidor Protparam mostram que a proteína é composta por 205 resíduos de aminoácidos, possui um peso molecular estimado em 21 kDa e um pI teórico de 4,34, essa característica está de acordo com o perfil da endoglucanase frequentemente encontradas em fungos filamentosos cujos pesos moleculares variam entre 20 e 50 kDa (Bagewadi *et al.* 2015, Karnchanatat *et al.* 2008; Kadowaki *et al.* 2015).

Adicionalmente, procedeu-se à avaliação desses mesmos parâmetros para a construção pET28a-EG45, apresentando os seguintes valores: 211 resíduos de aminoácidos, pI teórico de 5,12 e peso molecular de aproximadamente 22 kDa, com índice de instabilidade (II) calculado como 39,24, classificando a proteína como estável, conforme descreve Gamage *et al.* (2019), uma vez que proteínas com valor de índice de instabilidade (II) abaixo de 40 são proteínas estáveis.

Análises semelhantes foram conduzidas para o plasmídeo recombinante pET32a-EG45, onde apresentou os seguintes resultados: 363 resíduos de aminoácidos, peso molecular de aproximadamente 38 kDa e pI teórico de 4,90, índice de instabilidade calculado como 31,16, valor que também classifica a proteína como estável.

O aumento no comprimento e massa molecular deve-se à fusão com a tioredoxina (Trx), presente no vetor pET32a, uma estratégia bem estabelecida para melhorar a solubilidade de proteínas heterólogas expressas em *Escherichia coli* (LaVallie *et al.*, 2000). Estudos prévios demonstram que a Trx pode aumentar significativamente a taxa de solubilidade e facilitar a obtenção de proteínas ativas funcionalmente (Zhan *et al.* (2003).

A estimativa do pI teórico da proteína é importante para determinação do pH ideal na preparação dos tampões a serem utilizados nas etapas posteriores. Da mesma forma, a determinação do peso molecular é essencial para a avaliação da posição da proteína no gel de SDS-PAGE. O índice de instabilidade é outro fator importante, que indica a propensão de uma proteína a se desdobrar ou se tornar inativa em resposta a estímulos ou condições adversas, como variações de temperatura, pH, presença de agentes desestabilizadores, dentre outros fatores (Enany, 2014; Gamage *et al.*, 2019). Estes parâmetros são fundamentais para o desdobramento das etapas subsequentes dos experimentos.

3.1.2 Identificação e seleção das colônias transformadas

As transformações realizadas com os plasmídeos recombinantes pET28a_EG45 e pET32a_EG45 resultaram em crescimento eficiente de colônias nas placas seletivas, confirmando o sucesso da inserção dos plasmídeos nas diferentes cepas de *E. coli* utilizadas.

Observou-se formação de colônias nas placas contendo os antibióticos específicos, evidenciando a incorporação dos plasmídeos pelas células hospedeiras (Figura 9).

Esses resultados demonstram que tanto a cepa Rosetta (DE3) quanto a BL21 (pLysS) foram eficazes na transformação e, a partir dessas colônias positivas, foi possível dar continuidade às próximas etapas do experimento.

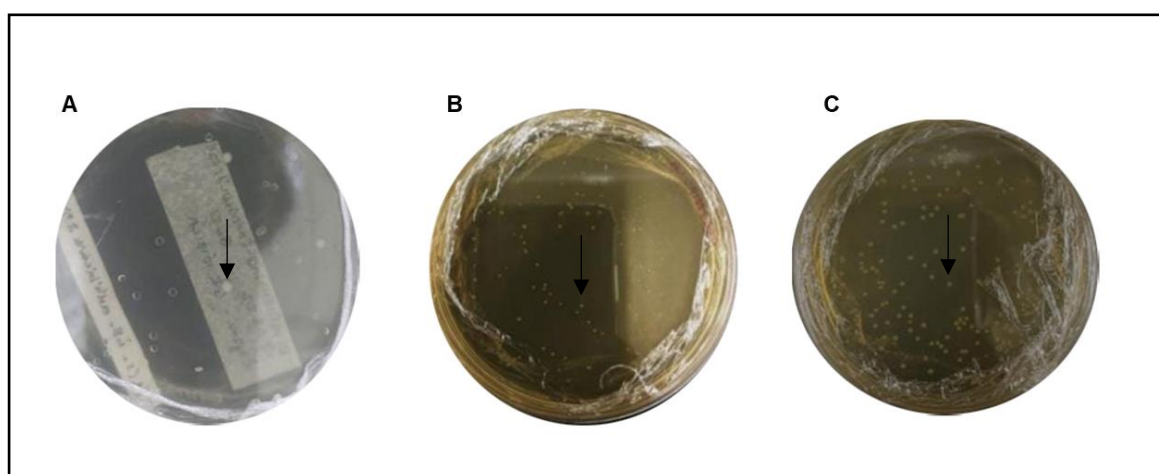


Figura 7: Transformação de pET28a-EG45 em *E. coli* Rosetta (DE3)(A); pET-32a-EG45 em *E. coli* Rosetta (DE3) (B), e pET-32a-EG45 em *E. coli* BL21 (*PLysS*) (C) com crescimento positivo.

Fonte: Autoria própria

3.2 EXPRESSÃO EM PEQUENA ESCALA: PRIMEIRAS EVIDÊNCIAS DE SOLUBILIDADE

Das colônias transformadas, duas foram selecionadas e submetidas a teste de expressão. Inicialmente, os ensaios de expressão de pET28a-EG45 recombinante em *Escherichia coli*, Rosetta (DE3), no entanto, não foi possível observar uma banda de super expressão com tamanho aproximado ao previsto de 21 kDa (Figura 10).

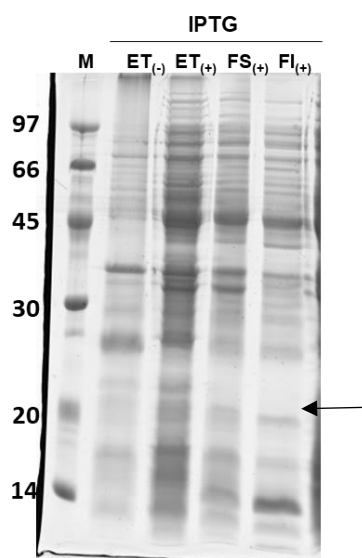


Figura 8: Expressão da endoglucanase 45 em vetor pET28a (pET28a-EG45) utilizando células de *E. coli* Rosetta (DE3) após indução a 37 °C por 4 horas com adição de 0,4mM IPTG. Gel SDS-PAGE14%; **M:** marcador de peso molecular para proteína de 14 a 97 kDa; **ET:** Extrato total; **(-):** sem IPTG; **(+):** com IPTG; **FS:** Fração solúvel; **FI:** Fração insolúvel.

Resultados semelhantes foram relatados por Hu *et al.* (2020), os quais descreveram ausência de expressão detectável de uma endoglucanase recombinante usando o vetor pET28a. Os autores superaram essa limitação substituindo o vetor pelo pCold TF, obtendo êxito na expressão em *E. coli* BL21 (DE3), destacando a importância da escolha do vetor para a expressão eficiente de proteínas de interesse.

No presente estudo, uma abordagem semelhante foi adotada, substituindo-se o vetor pET28a pelo pET32a, uma vez que este vetor contém a sequência de fusão com tioredoxina (*trx*A), reconhecidamente eficiente em aumentar a solubilidade de proteínas expressas (LaVallie *et al.*, 2000; Fam 2009).

Em sistemas bacterianos a tioredoxina é uma proteína compacta e altamente solúvel e termicamente estável que possui características dobráveis em sistema de *E. coli* (Lavallie *et al.* 2000). As fusões de tioredoxina provaram ser especialmente úteis para evitar a formação de corpos de inclusão. A tioredoxina pode desempenhar a função de uma chaperona molecular, impedindo a agregação e precipitação de proteínas a ela fundida, permitindo o dobramento correto da proteína de interesse (Geum, *et al.* 2015; Lavallie *et al.* 2000; Pinto, 2017; Yuan;Hua, 2002).

Outro fator que reforçou a escolha do vetor pET32a foi a análise da sequência da endoglucanase EG45, a qual revelou a presença de 14 resíduos de cisteína, com potencial para formação de ligações dissulfeto.

Aplicando-se as mesmas condições experimentais empregadas para o pET28a-EG45, a expressão da construção pET32a-EG45 foi avaliada nas cepas Rosetta (DE3) e BL21 (pLysS). Em Rosetta (DE3), foi observada, no SDS-PAGE, uma banda entre 30 e 45 kDa, compatível com o peso molecular estimado de 38 kDa para a proteína de fusão pET32a-EG45. Já nas amostras da cepa BL21 (pLysS), nenhuma banda correspondente foi detectada (Figura 11), sugerindo que a expressão é mais eficiente na cepa Rosetta (DE3), possivelmente devido à melhor adaptação ao uso de códons raros presentes no gene da endoglucanase.

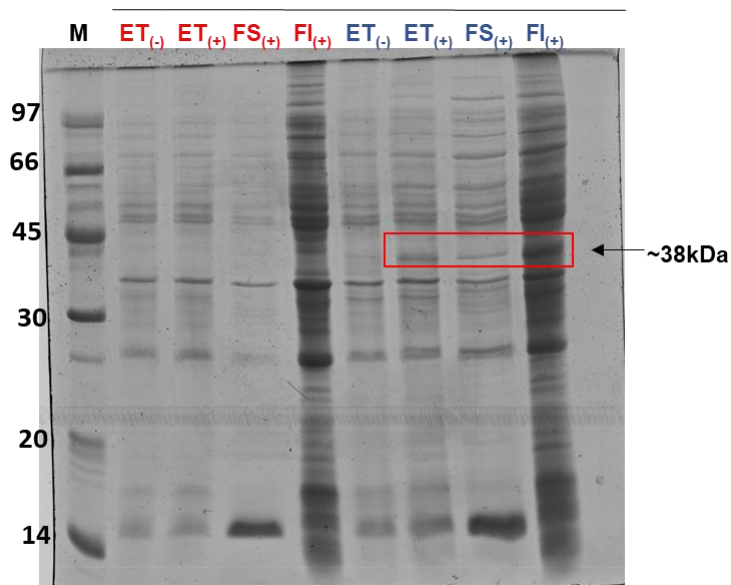


Figura 9: Expressão da endoglucanase 45 em vetor pET32a (pET32a- EG45) utilizando células de *E. coli* BL21 (PLysS) em vermelho; e em pET32a (pET32a- EG45) utilizando células de *E. coli*

Rosetta (DE3) em azul, após indução a 37 °C por 4 horas com adição de IPTG. Gel SDS-PAGE 14%; **M**: Marcador de peso molecular para proteína de 14 a 97 kDa; **ET**: Extrato total; **(-)**: sem IPTG; **(+)**: com IPTG; **FS**: Fração solúvel; **FI**: Fração insolúvel.

Fonte: autoria própria

Com base na visualização da banda com peso molecular de aproximadamente 38 kDa, em conformidade com o valor predito para a proteína de fusão pET-32a-EG45 em *E. coli* Rosetta (DE3) e fazendo um comparativo entre o controle negativo sem a adição de IPTG e o controle positivo com a adição de IPTG, é possível constatar uma banda visivelmente expressa no controle positivo, com tamanho aproximado de 38 kDa, sendo verificada nas frações solúvel e insolúvel, observando-se que a banda correspondente à EG45 acumula em maior proporção na fração insolúvel (FI), embora seja possível observar uma pequena quantidade na fração solúvel (FS). Dessa forma, os experimentos seguintes foram realizados a partir dos resultados obtidos para o plasmídeo recombinante pET32a-EG45 em *E. coli* Rosetta (DE3).

Trabalhos já reportados descreveram alguns fatores que afetam a produção solúvel de proteínas recombinantes, dentre esses fatores, inclui a seleção de uma cepa de expressão de *E. coli* modificada adequada que são projetadas para propósitos específicos, a exemplo de cepas que facilitam a formação de ligações dissulfeto, como, por exemplo, a Rosetta (DE3). Vários estudos relatam alto rendimento de produção solúvel de proteínas que requerem formação de ligação dissulfeto usando esses hospedeiros (Dung *et al.* 2022; Larsen *et al.* 2008; Neubauer *et al.* 2005). Dessa forma, a maior solubilidade observada na cepa Rosetta (DE3) é consistente com dados da literatura.

A substituição de vetor, como estratégia para melhorar a expressão e solubilidade, também tem respaldo em outros estudos. Por exemplo, Zeng *et al.* (2016) utilizaram o vetor pET32a para a expressão de uma endoglucanase de *Trichoderma virens* em *E. coli* BL21 (DE3), obtendo sucesso tanto na expressão quanto na recuperação da proteína ativa.

3.2.2 Purificação por cromatografia de afinidade da rGH45 (pET-32a-EG45) na fração insolúvel expressa em *E. coli* Rosetta (DE3)

A análise do gel SDS-PAGE (Figura 12) representando as frações coletadas, indicam que a proteína na forma solúvel foi eluída a partir de 500 mM de imidazol, onde foi possível constatar a presença de uma banda com maior pureza, porém com baixa intensidade, nas frações que apresentaram maior quantidade de proteína é possível identificar quantidade significativas de contaminantes.

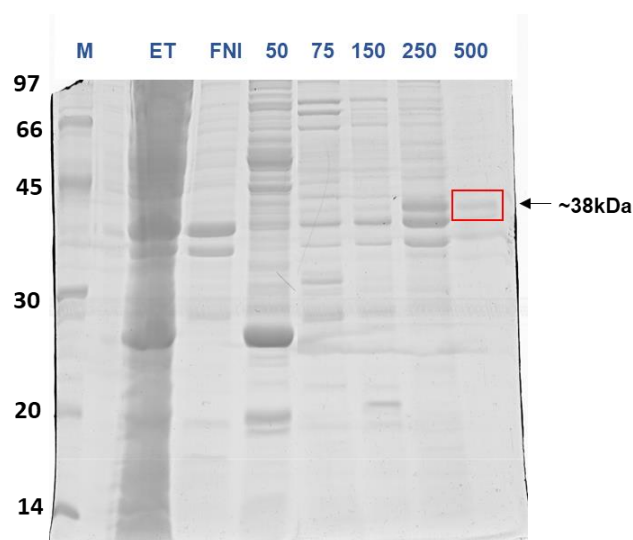


Figura 10: Purificação da proteína recombinante a partir da fração solúvel em vetor pET32a (pET32a-EG45) utilizando células de *E. coli* Rosetta (DE3) por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. SDS PAGE 14%; **M:** Marcador de peso molecular de proteína de 14 a 97 kDa; **ET:** Extrato total; **FNI:** Fração não interagida; **50 a 500:** Amostras eluídas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mM.

De acordo com Bresolin *et al.* (2009), esse método de purificação se baseia na capacidade dos íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida, apresentar afinidade seletiva por determinados grupos expostos na superfície de moléculas em solução, nesse caso, a proteína alvo apresenta uma cauda de poli-histidina, sendo utilizado o princípio da afinidade da histidina pelo íon Ni^{2+} . Isso se dá através da interação do íon metálico com o nitrogênio aromático do grupamento imidazol presente na histidina.

Embora o processo de purificação tenha apresentado uma amostra mais pura, o rendimento da proteína foi muito baixo em volume de proteína, inviabilizando a realização das etapas posteriores. Diante disso, tornou-se

necessário conduzir novos testes com o objetivo de aprimorar tanto o rendimento quanto a pureza da proteína na forma solúvel. Este processo se faz necessário para assegurar a obtenção do produto desejado com a qualidade e pureza necessárias para o andamento dos experimentos.

Foi feito um segundo método de purificação, a partir da proteína presente na fração insolúvel. Para isso, foi utilizada a estratégia de adição do agente desnaturante ureia. Conforme observa Bresolin *et al.* (2009), quando se visa o isolamento e a purificação de proteínas recombinantes presentes em corpos de inclusão, utilizando cromatografia de afinidade, há a possibilidade de separação eficiente de proteínas contendo cauda de histidina na presença de concentrações elevadas de agentes desnaturantes, como ureia.

Singh *et al.* (2015) e Vallejo e Rinas (2004), relatam que o uso de alta concentração de agentes caotrópicos como ureia resulta na ruptura completa da estrutura tridimensional da proteína, gerando uma proteína solúvel que é desprovida da sua conformação nativa. Esta proteína deve, então, ser transferida para condições que permitam a reconstituição de sua estrutura inicial.

Nesse processo, a fração insolúvel foi submetida a solubilização com ureia e purificação cromatográfica por afinidade. O isolamento proteico foi comprovado por SDS-PAGE 14 % sendo possível visualizar uma banda de aproximadamente de 38 kDa (Figura 13).

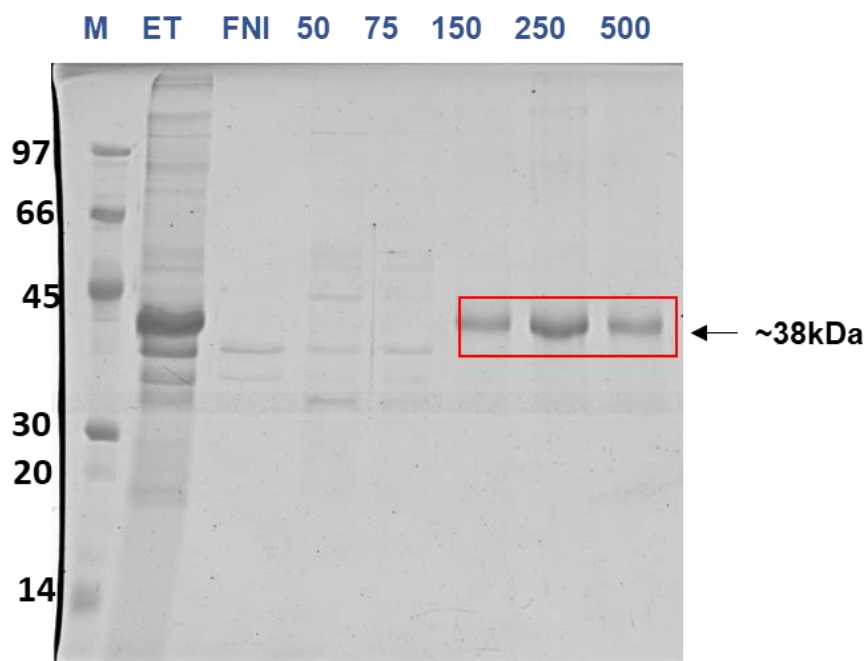


Figura 11: Purificação da proteína recombinante a partir da fração insolúvel em vetor pET32a (pET32a-EG45) utilizando células de *E. coli* Rosetta (DE3), por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. SDS PAGE 14 %; **M:** Marcador de peso molécula de proteína em de 14 a 97 kDa; **ET:** Extrato total; **FNI:** Fração não interagida; **50 a 500:** amostras eluidas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mM.

Fonte: autoria própria

Com base na análise do gel SDS-PAGE, a proteína rGH45 na forma insolúvel é eluída a partir de 150 mM de imidazol, onde é possível constatar a presença de uma banda com pureza e intensidade. Esses resultados sugerem que essas condições empregadas para a purificação foram adequadas, sendo possível obter a proteína pura, o que possibilitou seguir para a etapa de *refolding* para remoção da ureia, a fim de obter a proteína alvo em sua conformação inicial.

3.2.3 Análise da concentração de proteína total na fração insolúvel e teste funcional de atividade

A avaliação da atividade enzimática, realizada por meio do método DNS (Miller, 1959), revelou ausência de atividade detectável. Um fator que pode ter contribuído para esse resultado foi a baixa concentração da proteína total, determinada pelo método de Bradford (1976) como 0,1364 mg/mL. Outro fator a ser considerado é a desnaturação com a ureia. O processo de *refolding* pode não ter sido eficiente para renaturar a enzima para sua conformação ativa, o que influencia na baixa atividade enzimática. Essa baixa concentração, proveniente da

fração insolúvel após o *refolding*, possivelmente comprometeu a detecção da atividade enzimática no ensaio.

Estes resultados indicam que a estratégia de purificação em corpos de inclusão pode não ser a mais adequada para a proteína em análise. Nesse contexto, Vadala *et al.* (2009) destacam que a expressão de proteínas recombinantes em corpos de inclusão sempre apresenta desafios significativos na fase de purificação.

Marco *et al.* (2005) também destacam que embora o isolamento e a solubilização química dos corpos de inclusão sejam simples, os protocolos para subsequente redobramento *in vitro* são muitas vezes demorados e trabalhosos. Raramente eles produzem altos rendimentos de proteínas solúveis, das quais apenas uma pequena fração são proteínas nativamente redobradas.

Diante deste panorama, considerou-se algumas estratégias para obtenção da proteína na forma solúvel. Segundo Gopal *et al.* (2013), uma abordagem eficaz para evitar ou reduzir a formação de corpos de inclusão consiste em diminuir a temperatura de cultivo do hospedeiro na etapa de indução. Corroborando essa afirmação, Vadala *et al.* (2021), adotaram a estratégia de indução lenta, adicionando 0,5 mM de IPTG por 16 horas a 28 °C. Tal estratégia viabilizou a expressão da celulase na forma solúvel em vez de se acumular nos corpos de inclusão.

Dentre as estratégias empregadas para promover a expressão de proteínas recombinantes na forma solúvel, o controle da temperatura de indução também é amplamente discutido. Segundo Falak *et al.* (2022), a redução da temperatura de indução é uma técnica bem estabelecida para minimizar a agregação de proteínas recombinantes em *E. coli*. Essa diminuição da temperatura favorece um adequado dobramento da proteína recém-sintetizada devido a diversos fatores, tais como uma taxa de tradução mais lenta, uma redução na auto associação da proteína e alterações na cinética de dobramento da cadeia polipeptídica.

3.2.4 Expressão da proteína recombinante rGH45 na fração solúvel sob condições otimizadas

Buscando a expressão da proteína na forma solúvel, foi delineado um ensaio de expressão da proteína, conforme detalhado na Tabela 4 da seção 2.2.6.

A partir da análise dos resultados através de gel de poliacrilamida SDS-PAGE 14%, foi possível observar uma banda nitidamente definida, na concentração de IPTG de 1,0 mM a 37 °C por 4 horas (Figura 14), indicando, portanto, que as condições testadas foram promissoras para expressão da proteína na forma solúvel.

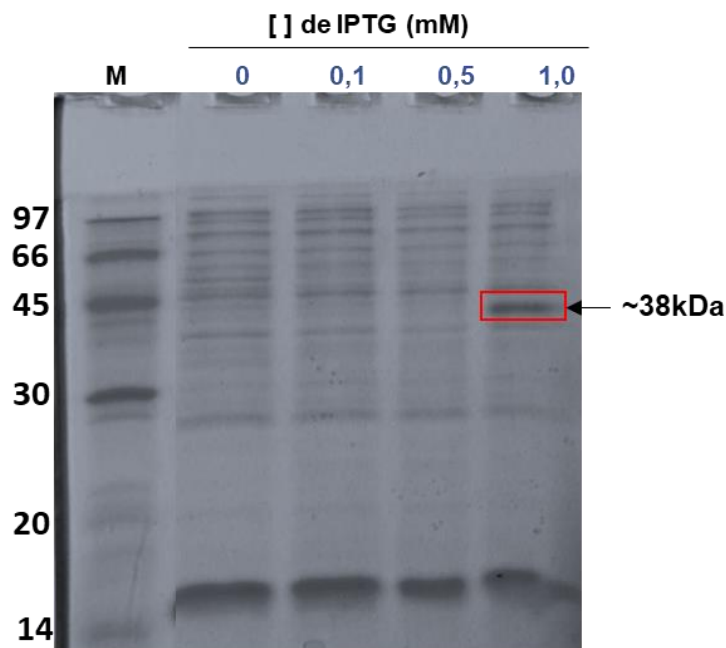


Figura 12: Expressão da endoglucanase 45 em vetor pET32a (pET32a- EG45) utilizando células de *E. coli* Rosetta (DE3) em azul, após indução a 37 °C por 4 horas com variação da concentração de IPTG. Gel SDS-PAGE 14%; M: Marcador de peso molecular para proteína de 14 a 97 kDa; **Concentração de IPTG:** 0 mM; 0,1 mM; 0,5 mM; 1,0 mM.
Fonte: autoria própria

Com base nesse resultado, pode-se inferir que a concentração do indutor IPTG influenciou significativamente para a expressão solúvel da proteína rGH45 em vetor pET32a. A influência da concentração de IPTG na expressão de proteínas recombinantes é amplamente documentada. Shahzadi et al. (2021) demonstraram que ajustes na concentração do indutor podem impactar diretamente na solubilidade e rendimento proteico. De forma semelhante, Nakazawa et al. (2008) relataram sucesso na expressão de domínios catalíticos de endoglucanases de *Trichoderma reesei* em *E. coli* utilizando vetores pET e concentração de IPTG de 1 mM.

A obtenção bem sucedida de proteína recombinante rGH45 na forma solúvel representa um avanço importante, sobretudo ao considerar-se que se trata da primeira expressão heteróloga descrita de uma endoglucanase (GH45) originada do fungo fitopatígeno *Moniliophthora perniciosa*, esse fato também pode diferenciá-la funcionalmente. Estudos como os de Kubicek *et al.* (2014) demonstram que celulasas de patógenos de plantas muitas vezes evoluíram para atuar de forma sinérgica com fatores de virulência, possibilitando maior penetração na parede celular vegetal.

Esse aspecto sugere que a rGH45 obtida possa apresentar particularidades catalíticas que a tornem interessante para aplicações biotecnológicas voltadas à biodegradação seletiva de substratos lignocelulósicos, com potencial sinérgico quando combinada com outras celulasas.

3.2.5 Produção em larga escala e purificação da rGH45 solúvel

No ensaio em larga escala, foi possível obter quantidade satisfatória de proteína recombinante (rGH45) em sua forma solúvel. A análise da proteína purificada, por meio de eletroforese em gel SDS-PAGE a 14%, evidenciou a presença da proteína de interesse, mostrando que o processo de purificação foi bem-sucedido.

Os resultados a partir da análise do gel SDS-PAGE das frações coletadas (50 mM, 75 mM, 150 mM, 250 mM e 500 mM) (Figura 15), mostram que a proteína na forma solúvel foi eluída em 250 mM de imidazol, sendo observada a presença de uma banda com maior pureza e alta intensidade. Essa eluição em 250 mM de imidazol durante a purificação por cromatografia de afinidade indicou afinidade adequada pela histidina (His) da proteína com a matriz de Ni²⁺.

Após a purificação e diálise, a proteína foi concentrada para determinação da proteína total, segundo o método Bradford (1976), e apresentou uma concentração de 27,94 mg/L. O rendimento obtido, aliado à pureza da proteína recombinante, viabilizou a condução de ensaios subsequentes para caracterização bioquímica e funcional da enzima, incluindo testes de pH ótimo, temperatura ótima e atividade catalítica.

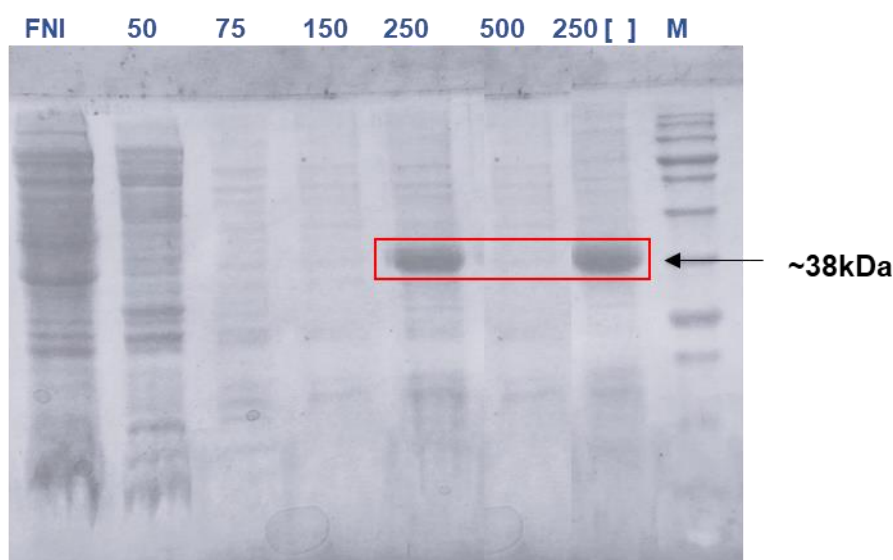


Figura 13: Purificação da proteína recombinante a partir da fração solúvel em vetor pET32a (pET32a-EG45) utilizando células de *E. coli* Rosetta (DE3) por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. SDS-PAGE 14%; M: Marcador de peso molecular de proteína de 10 a 180 kDa; **FNI:** Fração não interagida; **50 a 250:** Amostras eluídas com as concentrações de imidazol variando de 50 a 500 mM; **250 []:** proteína purificada concentrada.
Fonte: autoria própria

3.2.6 Determinação dos parâmetros ótimos de atividade da proteína solúvel: efeitos do pH e da temperatura

A otimização da enzima endoglucanase recombinante de *Moniliophthora perniciosa* visa a determinação das melhores condições reacionais, em termos de pH e temperatura de reação, para aplicação da enzima em processos de hidrólise de biomassa lignocelulósica.

Os resultados da atividade enzimática obtidos para a endoglucanase recombinante nas condições de pH e temperatura analisadas usando o planejamento experimental de Doehlert são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Planejamento Doehlert aplicado na determinação das condições ótimas de pH e temperatura da endoglucanase recombinante de *M. perniciosa* e resultados obtidos.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	UA (μmol/min)	Valores Preditos (UA)	Resíduo
1	5	70	0,160	0,164	-0,004
2	7	70	0,221	0,216	0,004
3	4	50	0,217	0,212	0,004
4 C	6	50	0,274	0,277	-0,003
5 C	6	50	0,281	0,277	0,004

6 C	6	50	0,278	0,277	0,004
7	8	50	0,224	0,228	-0,004
8	5	30	0,144	0,148	-0,004
9	7	30	0,116	0,111	0,005

A endoglucanase de *Moniliophthora perniciosa* demonstrou atividade ótima em pH 6,0 e 50 °C, utilizando carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Esses valores indicam uma boa adequação da enzima para processos enzimáticos em condições levemente ácidas e temperaturas moderadas, o que é compatível com aplicações industriais voltadas para a produção de açúcares fermentáveis a partir de biomassa lignocelulósica.

Essa enzima apresenta semelhanças relevantes com outras endoglucanases estudadas na literatura. Por exemplo, Gavande *et al.* (2022) caracterizaram uma endoglucanase recombinante de *Ruminococcus flavefaciens* expressa em *E. coli*, que apresentou atividade ótima em pH 5,5 e 55 °C. Embora a enzima bacteriana atue em um pH mais ácido e temperatura ligeiramente superior, ambas compartilham alta atividade sobre CMC e estabilidade em faixas semelhantes de pH e temperatura.

Dessa forma, assim como a enzima de *R. flavefaciens* a enzima de *M. perniciosa*, mostrou eficiência catalítica significativa na conversão de polissacarídeos, sendo potencialmente útil na degradação de biomassa.

Outro exemplo comparável é a endoglucanase GH12 de *Aspergillus terreus*, caracterizada por Segato *et al.* (2017), que apresentou atividade ótima em 55 °C e pH 5,0, além de estabilidade térmica até 60 °C. Tal como a enzima de *M. perniciosa*, essa endoglucanase demonstrou atividade sobre CMC, indicando que ambas atuam de forma eficiente sobre substratos solúveis derivados da celulose, reforçando o potencial da enzima de *M. perniciosa* em processos industriais semelhantes.

No presente estudo, os valores de pH e temperatura influenciaram a atividade enzimática, que foi menor no tampão citrato-fosfato em pH 7,0 e 30 °C - valores críticos foram apresentados pelo modelo.

A superfície de resposta obtida (Figura 16A) é caracterizada como uma superfície máxima. O modelo expresso pela Equação abaixo (Equação 1) foi

gerado seguindo a associação entre pH e temperatura na atividade enzimática, com base em análise de regressão aplicada a dados experimentais.

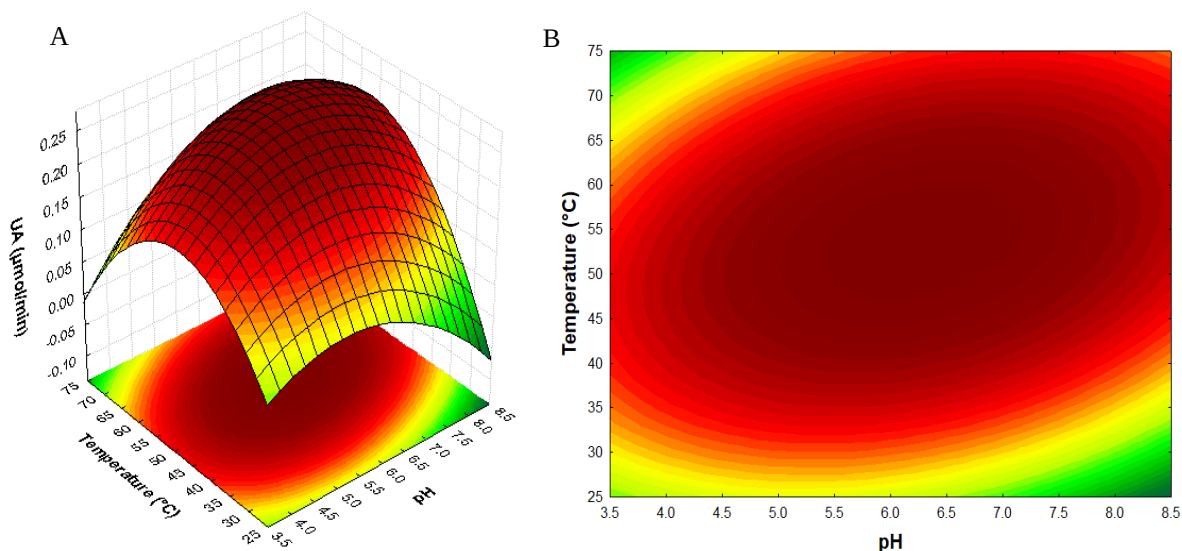


Figura 14: Gráfico de Superfície (A) e Gráfico de área (B) obtidos a partir da aplicação do planejamento experimental Doehlert, na otimização do pH e temperatura de celulase de *M. perniciosus*.

Fonte: Autoria própria

Equação 1: UA ($\mu\text{mol/min}$): $-0,646740(\pm 0,043282) + 0,043282(\pm 0,010621)\text{pH} - 0,014292(\pm 0,000801)\text{pH}^2 + 0,020619(\pm 0,000804)\text{T} - 0,000258(\pm 0,000006)\text{T}^2 + 0,001112(\pm 0,000088)\text{pH} \times \text{T}$. Onde T é a temperatura.

A partir da derivação dessa função em relação a x e z, é possível encontrar um sistema de equações do primeiro grau que, resolvida, nos permite encontrar as coordenadas do ponto de máximo. Essas coordenadas representam as condições ótimas, 6,27 e 53,5°C para pH e temperatura, respectivamente. Essas condições podem ser aplicadas a fim de obter a maior atividade enzimática da enzima estudada. A aplicação do planejamento Doehlert, permitiu obter o gráfico de Pareto (Figura 17A), e o gráfico resíduos (Figura 17B).

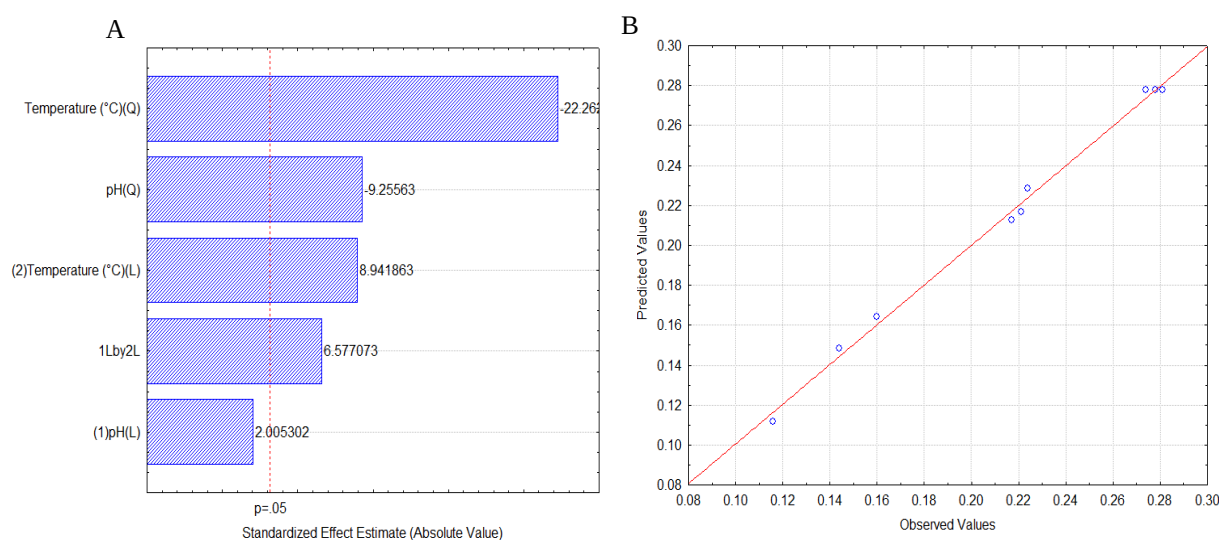


Figura 15: Gráfico de Pareto (A) e Gráfico de resíduos (B) obtidos a partir da aplicação do planejamento experimental Doehlert, na otimização do pH e temperatura de celulase de *M. perniciosus*.

Fonte: autoria própria

A análise da Figura 17A permite identificar que as variáveis temperaturas tanto lineares quanto quadráticas são capazes de influenciar na resposta máxima, que é a atividade enzimática. Em relação ao pH, apenas o pH quadrático é capaz de influenciar na atividade da enzima estudada. A análise da Figura 17B permite observar que existe uma boa relação entre valores preditos *versus* valores encontrados, pois, os pontos de interseção entre esses componentes apresentam-se bem próximo da reta, caracterizando baixo resíduo, confirmado com os dados da tabela 6. O R^2 obtido foi igual a 0,99, indicando que 99% dos resultados encontrados podem ser explicados por este modelo experimental.

A Tabela 7 apresenta a Análise de Variância (ANOVA) oriunda dos resultados obtidos a partir da aplicação do planejamento experimental Doehlert na otimização do pH e temperatura da endoglucanase de *M. perniciosus*.

Tabela 7: Análise de Variância – ANOVA, obtida a partir dos resultados da aplicação do planejamento de Doehlert para otimização do pH e temperatura da celulase produzida por *M. pernicioso*.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	0.029612	5	0.005922	129.37	5.30
Resíduo	0.000137	3	4.58E-05		
Falta de ajuste	0.000113	1	0.000113	9.13	18.01
Puro erro	0.000025	2	0.000012		
SQ total	0.029750	8			

SQ: Soma dos Quadrados; GL: Graus de Liberdade; MQ: Quadrado médio;
Fonte: Autoria própria

A avaliação da Tabela 7 indica que a função quadrática utilizada na descrição do comportamento da resposta permitiu a otimização do pH e temperaturas da celulase de *M. pernicioso*, com resultados significativos: $F_{\text{calculado}}$ (129.37) > F_{tabelado} (5.30) para regressão, e $F_{\text{calculado}}$ (9.13) < F_{tabelado} (18.01) para falta de ajuste, com $p < 0,05$, mostrando que o modelo está bem ajustado. Portanto, os resultados experimentais encontrados não são de ordem aleatória, sendo aplicáveis dentro da região experimental estudada, com 95% de confiança.

Assim, a produção recombinante da GH45 não apenas demonstra seu potencial biotecnológico, como também estabelece um precedente relevante para futuros estudos com o fungo *Moniliophthora pernicioso* como fonte de enzimas celulolíticas voltadas à expressão heteróloga. Esse avanço é especialmente significativo para indústrias como a de bioetanol e de processamento de biomassa, que demandam biocatalisadores mais específicos, eficientes e sustentáveis.

4 CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho resultou na expressão heteróloga bem sucedida de uma endoglucanase recombinante da família GH45 proveniente do fungo fitopatogênico *Moniliophthora perniciosa*, utilizando o sistema de expressão em *Escherichia coli* Rosetta (DE3) com o vetor pET32a. A estratégia adotada, incluindo a fusão com a proteína tioredoxina e a otimização das condições de indução com IPTG, permitiu a obtenção da enzima em sua forma solúvel e ativa, alcançando uma concentração de proteína solúvel total de 27,94 mg/L.

A enzima apresentou atividade ótima a pH 6,0 e 50 °C, condições compatíveis com processos industriais de sacarificação de biomassas lignocelulósicas, reforçando sua aplicabilidade em processos de produção de açúcares redutores. Esses parâmetros fisiológicos estão dentro das faixas desejáveis para aplicações industriais, uma vez que muitas biomassas residuais operam eficientemente em ambientes levemente ácidos e temperaturas moderadas.

Além disso, o estudo revisou sobre a produção de proteínas recombinantes, especialmente celulasas, destacando o papel central da *E. coli* como hospedeiro preferencial devido à sua taxa de crescimento rápida, facilidade de manipulação genética e escalabilidade. A combinação desses fatores com a estratégia de expressão adotada neste trabalho contribuiu de maneira decisiva para o sucesso na obtenção da proteína funcional.

O caráter inovador e inédito da pesquisa reside na utilização de um fungo fitopatogênico como fonte de uma enzima com potencial biotecnológico, algo ainda pouco explorado na literatura. A escolha de *M. perniciosa*, tradicionalmente estudado por seu impacto negativo em culturas agrícolas, revela uma abordagem inovadora ao transformar um agente patogênico em uma fonte valiosa de biocatalisadores.

A endoglucanase obtida apresenta características promissoras e, com futuras validações e otimizações, poderá vir a compor formulações enzimáticas voltadas para a hidrólise de resíduos agroindustriais, especialmente no contexto da produção de biocombustíveis de segunda geração.

Dessa forma, o trabalho não apenas contribui com novos dados à literatura sobre celulasas recombinantes, como também amplia as perspectivas de aplicação industrial de enzimas obtidas a partir de microrganismos não convencionais, alinhando-se às demandas atuais por tecnologias sustentáveis e economicamente viáveis para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos.

Referências

- AKHTAR, N. *et al.* Biodiversity of cellulase producing bacteria and their applications. **Cellulose chemistry and technology**, v. 50, n. 9-10, p. 983-995, 2016.
- ALMEIDA, L. E. S, Ribeiro G. C. A, Assis, S. A. (2022). β -Glucosidase produced by *Moniliophthora perniciosa*: Characterization and application in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(3), 96-973. <https://doi.org/10.1002/bab.2167>
- AMRAINI, S. Z. *et al.* Production and characterization of cellulase from *E. coli* EgRK2 recombinant based oil palm empty fruit bunch. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 22, p. 287-295, 2017.
- BAGEWADI, Z. K.; NINNEKAR, H. Z. Production, purification and characterization of endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic waste. **Int J Biotechnol Biomed Sci**, v. 1, p. 25-32, 2015.
- BARUAH, J. *et al.* Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, p. 141, 2018.
- BENEVIDES R. G, A. S. A, Vitor A. B., Ribeiro G. C, Santana C. S, Almeida L. E. S. (2021). Recombinant fungal cellulases for the saccharification of sugarcane bagasse. <https://www.intechopen.com/chapters/77121>.
- BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1288-1296, 2009.
- BRONDYK, W. H. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. **Methods in enzymology**, v. 463, p. 131-147, 2009.
- CARVAJAL-RIVERA, A. S. *et al.* Temporal dynamics of witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*) in six cocoa clones with and without shading. **Journal of Plant Pathology**, p. 1-12, 2021.
- CHUNG, D.; Cha, M.; Guss, A. M.; Westpheling, J. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2014
- DADWAL, A.; SHARMA, S.; SATYANARAYANA, T. Recombinant cellobiohydrolase of *Myceliophthora thermophila*: characterization and applicability in cellulose saccharification. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DOS SANTOS, D. M. R. C. *et al.* Production, Purification, Characterization, and Application of Halotolerant and Thermostable Endoglucanase Isolated from *Pycnoporus sanguineus*. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-12, 2023.

DUNG, C. T. *et al.* PURIFICATION OF RECOMBINANT ENDOGLUCANASE GH5-CBM72-CBM72 EXPRESSED IN *Escherichia coli*. **Journal of Biology**/Tạp chí Sinh Học, v. 44, n. 3, 2022.

ENANY, S. Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*. **Journal of infection and public health**, v. 7, n. 4, p. 296-307, 2014.

FALAK, S.; SAJED, M.; RASHID, N. Strategies to enhance soluble production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Biologia**, v. 77, n. 3, p. 893-905, 2022.

FAM, H. K. Subcloning *emoA* into pET32a (+), pET32a (+) Δ *trxA*/+ *fre* and pET32a (+) Δ *trxA* to Assess the Relative Effect of Thioredoxin A and Flavin Oxidoreductase on *emoA* Solubility. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI) Vol**, v. 13, p. 114-118, 2009.

FERREIRA, R. da G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S.. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, p. 1-13, 2018.

GAETE, A. V.; DE SOUZA TEODORO, C. E.; MARTINAZZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e567985785-e567985785, 2020.

GAMAGE, D. G. *et al.* Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction. **Protein and peptide letters**, v. 26, n. 5, p. 339-347, 2019.

GARVEY, M. *et al.* Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 10, p. 581-593, 2013.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. (In) The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. **Humana press**. p. 571-607, 2005.

GAVANDE, P. V. *et al.* Highly efficient, processive and multifunctional recombinant endoglucanase RfGH5_4 from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 v3 for recycling lignocellulosic plant biomasses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 801-813, 2022.

GEUM, L. *et al.* Construction of recombinant expression vectors to study the effect of thioredoxin on heterologous protein solubility. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 19, p. 1-5, 2015

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl Chem** 1987;59(2):257–68. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

GOMES, A. R. *et al.* An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 4, n. 7, p. 346-356, 2016.

GOPAL, G. J.; KUMAR, Awanish. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The protein journal**, v. 32, p. 419-425, 2013.

GUTIERREZ, R.; MARTÍN DEL VALLE, E. M.; GALAN, M. A. Immobilized metal-ion affinity chromatography: status and trends. **Separation & Purification Reviews**, v. 36, n. 1, p. 71-111, 2007.

JAIN, L.; AGRAWAL, D. Biofuel cellulases: Diversity, distribution and industrial outlook. In: **Microbial Fermentation and Enzyme Technology**. CRC Press, 2020. p. 283-298.

KADOWAKI, M. Na. S..*et al.* Functional characterization and low-resolution structure of an endoglucanase Cel45A from the filamentous fungus *Neurospora crassa* OR74A: thermostable enzyme with high activity toward lichenan and β -glucan. **Molecular Biotechnology**, v. 57, p. 574-588, 2015.

KARNCHANATAT, A. *et al.* A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 5, p. 404-413, 2008.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803-822, 2018.

KUBICEK, C. P.; STARR, T. L.; GLASS, N. L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. **Annual review of phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 427-451, 2014.

LARSEN, M. W.; BORNSCHEUER, U. T.; HULT, K. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. **Protein expression and purification**, v. 62, n. 1, p. 90-97, 2008.

LAVALLIE, E. R. *et al.* Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2000. p. 322-340.

LAVALLIE, E. R. *et al.* Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 322-340, 2000.

LI, H. *et al.* Discovery and characterization of a new β -glucosidase from *Wolfiporia cocos* through RNA sequencing and heterologous expression in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 299, p. 139974, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139974>

MARCO, A. *et al.* Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid-or benzyl alcohol–overexpressed molecular chaperones. **Cell stress & chaperones**, v. 10, n. 4, p. 329, 2005.

MORÃO, L. G. *et al.* A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. **Plos one**, v. 17, n. 7, p. e0271403, 2022.

OVERTON, Tim W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug discovery today**, v. 19, n. 5, p. 590-601, 2014.

PINTO, K. R. **Expressão heteróloga da enteroquinase em enzima *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas. 2017.

POURESMAEIL, M.; AZIZI-DARGAHLOU, S. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. **Archives of microbiology**, v. 205, n. 5, p. 212, 2023.

RAMOS, C. R. R. *et al.* A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1103-1109, 2004

RIBEIRO G. C, Assis, S.A. Production of β -glucosidase by *Rhodotorula oryzae* and use of enzyme for hydrolysis of sugarcane bagasse delignified. **Journal of Food Science and Technology**, 60(11), 2761-2771. 2023
<https://doi.org/10.1007/s13197-023-05783-3>.

SANTANA M. L. *et al.* Production and characterization of carboxymethylcellulase by submerged fermentation of *Moniliophthora perniciosa*. **Catalysis Research** 2023; 3(2): 019; doi:10.21926/cr.2302019.

SANTANA, C. S. de. **Caracterização molecular e estrutural de uma endoglucanase de *Moniliophthora perniciosa* (STAHLE) AIME & PHILLIPS-MORA**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 2020

SANTANA, M. L. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa***. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, BA, 2010

SEGATO, F. *et al.* Cloning, heterologous expression and biochemical characterization of a non-specific endoglucanase family 12 from *Aspergillus terreus* NIH2624. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 4, p. 395-403, 2017.

SHAHZADI, I. *et al.* Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 7145, 2021.

SHARADA, R. *et al.* Applications of Cellulases—review. **Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.** 2014.

SINGH, A. *et al.* Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2015.

SUTAONEY, P. *et al.* Current perspective in research and industrial applications of microbial cellulases. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 130639, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130639>

SUWANNARANGSEE, S. *et al.* Otimização de sistemas enzimáticos sinérgicos de degradação de biomassa para hidrólise eficiente de palha de arroz usando um projeto de mistura experimental. **Tecnologia de Biorecursos**, v. 252-261, 2012.

TEGEL, H. *et al.* Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). **Protein expression and purification**, v. 69, n. 2, p. 159-167, 2010.

VADALA, B. S.; DESHPANDE, S.; APTE-DESHPANDE, A. Soluble expression of recombinant active cellulase in *E. coli* using *B. subtilis* (natto strain) cellulase gene. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, p. 1-7, 2021.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial cell factories**, v. 3, p. 1-12, 2004.

VITOR, A. B. *et al.* Cloning, heterologous expression and characterization of β -glucosidase deriving from *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime and Phillips Mora. **3 Biotech**, v. 14, n. 11, p. 287, 2024.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1119-1139, 2012.

ZHANG, Z.-X. *et al.* Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. **Microbial cell factories**, v. 21, n. 1, p. 191, 2022.