

Efeito das proteínas hidrofobinas no sistema de cocultivo fúngico de *Trichoderma reesei* e *Pleurotus citrinopileatus*

Peixoto, A. S¹; Castro, L. G¹; Todorov, C. R. M¹; De Paula, M. F. S. M¹; Cardoso, M. A¹; Vieira, R. I. M.¹; Gomes, T. G¹; Noronha, E. F²; Filho, E. X. F²; Miller, R. N.G¹;

¹Laboratório de Interação Planta-Praga; Departamento de Biologia Celular; Instituto de Ciências Biológicas; Universidade de Brasília

²Laboratório de Enzimologia; Departamento de Biologia Celular; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

Palavras chave: CAZymes; Biocombustíveis; HFBs; Lignocelulose; Consórcio fúngico

Resumo: Com o aumento da demanda por energia, a bioenergia de segunda geração (2G) torna-se uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis e bioprodutos a partir de resíduos agroindustriais, permitindo expandir a produção de energia sem necessidade de novas áreas de cultivo. O bagaço de cana é uma fonte abundante de biomassa. Contudo, a complexidade de sua estrutura, composta principalmente por polissacarídeos e lignina, é um desafio para o aproveitamento energético. Fungos filamentosos possuem uma grande diversidade de *CAZymes* (enzimas ativas em carboidratos). Consórcios fúngicos de ascomicetos e basidiomicetos podem otimizar a conversão da biomassa. Em *screening* prévio foi definido o sistema de cocultivo entre *Trichoderma reesei* RUT-C30 e *Pleurotus citrinopileatus* como o mais promissor entre 21 combinações. A adição de elementos externos, como as proteínas hidrofobinas (HFBs) nos sistemas de cocultivo pode aumentar a eficiência de sacarificação da biomassa vegetal, devido às propriedades anfifílicas dessas proteínas, que aumentam a interação entre enzimas e a biomassa lignocelulósica, melhorando a dispersão das enzimas e a adesão dos fungos à superfície do substrato. Este projeto visa caracterizar o perfil enzimático do sistema de cocultivo de *Trichoderma reesei* RUT-C30 e *Pleurotus citrinopileatus* em meio complexo com adição das HFBs. Os cultivos foram realizados com quantidades iguais de micélio de ambos os organismos e com a adição de HFBs liofilizadas em concentrações de 0,002 mg/mL e 0,004 mg/mL, sendo então incubados a 28°C, por um período de nove dias, com coletas de alíquotas de 1 mL a cada dia. Foram quantificadas as atividades enzimáticas de endoglucanases, hemicelulases, pectinases, β-glicosidases, β-xilosidases, Mn peroxidase, proteases totais e lacase, utilizando métodos colorimétricos específicos para cada enzima. A análise enzimática revelou um aumento

significativo de atividade na presença de HFBs. A concentração de 0,004 mg/mL foi a mais eficaz, especialmente no dia 8, destacando o potencial biotecnológico do processo para intensificação enzimática. Esses resultados promissores serão aprofundados em análises proteômicas para explorar suas potencialidades. Devido ao alto custo das hidrofobinas comerciais, a expressão heteróloga dos genes que as codificam foi considerada a alternativa mais viável para garantir quantidades e concentrações adequadas. Para isso, foi construído um sistema de expressão em *Komagataella phaffii*, com genes de HFBs oriundos de *P. pulmonarius* (basidiomiceto) e *T. reesei* (ascomiceto) foram otimizados e inseridos no vetor pPIC9. Após amplificação em *E. coli* XL10-Gold e confirmação por PCR, o plasmídeo foi linearizado e transformado em *K. phaffii* por eletroporação para integração genômica. As colônias transformadas serão cultivadas em meio seletivo, com indução da expressão heteróloga com metanol. A expressão e secreção das HFBs serão verificadas por SDS-PAGE e as proteínas serão purificadas por cromatografia de afinidade e ultrafiltração. As HFBs demonstram elevado potencial para otimizar a eficiência na bioconversão de resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana, contribuindo para a redução de custos e maior sustentabilidade nos processos industriais. As análises proteômicas elucidaram interações moleculares no cocultivo fúngico, destacando mecanismos sinérgicos que potencializam a degradação da biomassa, sinalizando novas oportunidades para aplicações biotecnológicas baseadas em recursos renováveis.