

Produção heteróloga e caracterização funcional das expansinas de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7

Kelly Barreto Rodrigues¹, Amanda Araújo Souza², Jéssica de Sá Guimarães Peixoto³, Caio de Oliveira Gorgulho Silva⁴, Larissa Andreani⁵, Thaís Demarchi Mendes⁶, Leonardo Valadares⁷, Patrícia Verardi Abdelnur⁸, Fabrício Machado Silva⁹, Sílvia Belém Gonçalves¹⁰, Dasciana de Sousa Rodrigues¹¹, Thaís Fabiana Chan Salum¹², Monica Caraméz Trichez Damaso¹³, Léia Cecília de Lima Fávoro¹⁴

Resumo

As expansinas são proteínas encontradas em diferentes organismos e especialmente em plantas. Elas estão envolvidas em vários processos e atuam no rompimento das ligações não covalentes entre as microfibrilas de celulose por um mecanismo não enzimático, levando ao afrouxamento e extensão da fibra. Elas têm sido investigadas como um aditivo na sacarificação de lignocelulose e para modificação das propriedades físicas da celulose, entre outras aplicações (papel e celulose, rações, têxtil). Ainda não há expansinas de plantas comercialmente disponíveis, em parte devido à dificuldade de produção heteróloga dessas proteínas. Assim, é necessário viabilizar a produção recombinante de expansinas de plantas em microrganismos em quantidade suficiente para aplicações diversas. O objetivo deste trabalho foi produzir heterologicamente duas novas expansinas de cana-de-açúcar e caracterizá-las funcionalmente. As expansinas SacEXP4 (β -expansina) e SacEXP7 (α -expansina) foram produzidas por *Pichia pastoris* X-33 e o extrato proteico dialisado e concentrado contendo as expansinas foi aplicado em testes de sacarificação de bagaço de cana pré-tratado pelo método organosolv e em testes de extensibilidade de fibras de papel filtro. A β -expansina SacEXP4 apresentou um efeito positivo na liberação de açúcar redutor total na sacarificação de bagaço organosolv com celulase comercial, porém esse efeito foi similar ou menor do que o efeito de uma proteína de sacrifício tal como BSA. As expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 têm a capacidade de romper as ligações de hidrogênio do substrato em pH 4,8 a 30°C. A redução da força tênsil da celulose do papel filtro foi mais pronunciada para a β -expansina SacEXP4 e foi semelhante ao controle positivo (ureia 8M). As expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 são ativas e podem ser aplicadas (conforme testado) sem a necessidade de purificação, para diminuir a resistência à tração de fibras de celulose, como as que compõem o papel filtro ou outros tipos de materiais celulósicos.

¹ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, kellybiobarreto@gmail.com

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, amandhacoelho@gmail.com

³ Bióloga, doutora em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, colaboradora da Embrapa Agroenergia, jessica_guimaraes15@hotmail.com

⁴ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, colaborador da Embrapa Agroenergia, caio.gorgulho@gmail.com

⁵ Química, doutora em Química, analista da Embrapa Agroenergia, larissa.andreani@embrapa.br

⁶ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁷ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, leonardo.valadares@embrapa.br

⁸ Química, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

⁹ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, professor da Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

¹⁰ Engenheira Química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

¹¹ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

¹² Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

¹³ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

¹⁴ Bióloga, doutora em Ciências, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

Palavras-chave: expansinas, *Saccharum*, *Pichia pastoris*, *Komagataella phaffii*, força tênsil, hidrólise enzimática.

Introdução

A cana-de-açúcar (complexo *Saccharum*) é a principal matéria-prima utilizada para o desenvolvimento de biorrefinarias de lignocelulose no Brasil, não somente pela conhecida produção de biocombustível (etanol de primeira e segunda geração), açúcar, bioeletricidade, biomassa para ração animal, mas também pela obtenção de diversos outros produtos (Conab, 2019). A disponibilidade de informações da sequência genômica da cana-de-açúcar tem facilitado a caracterização funcional de genes e de proteínas visando a alta produtividade e qualidade desta cultura.

As expansinas são proteínas encontradas em diferentes organismos e especialmente em plantas. Elas estão envolvidas em vários processos e atuam no rompimento das ligações não covalentes entre as microfibrilas de celulose por um mecanismo não enzimático, levando ao afrouxamento e extensão da fibra (Santiago et al., 2018). Devido a essas características, elas têm sido investigadas não somente como um aditivo na sacarificação enzimática de biomassa lignocelulósica (o afrouxamento causado pelas expansinas pode facilitar o acesso das celulasas às microfibrilas), mas também para modificação das propriedades físicas da celulose, entre diversas outras aplicações na indústria química, de papel e celulose, de rações e têxtil. No entanto, ainda não há expansinas de plantas comercialmente disponíveis, em parte devido à dificuldade de produção heteróloga dessas proteínas. De fato, sua extração na forma nativa a partir de plantas não é viável pois estão presentes em pequenas quantidades nos tecidos vegetais. Assim, há uma grande necessidade por meios e métodos que viabilizem a produção recombinante de expansinas de plantas em microrganismos em quantidade suficiente para aplicações diversas.

O grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia identificou mais de 90 genes codificadores de expansinas de diferentes famílias no genoma da cultivar de cana-de-açúcar SP80-3280 (Santiago et al., 2018). Também foram identificados dois genes codificadores das β -expansinas SacEXP82 e SacEXP49, que apresentaram expressão gênica preferencial nos tecidos do colmo de plantas adultas (8 meses) da cultivar RB867515 (Pereira et al., 2017). Estas duas β -expansinas foram posteriormente produzidas por *Pichia pastoris* (reclassificada como *Komagataella phaffii*) e caracterizadas funcionalmente. Elas foram capazes de alterar as propriedades físicas da celulose por meio de diminuição significativa da força tênsil de fibras de celulose tratadas com extratos proteicos enriquecidos com essas expansinas (Peixoto, 2019).

O presente trabalho teve como objetivo dar continuidade à caracterização de expansinas de cana-de-açúcar. Uma β -expansina (SacEXP4) e uma α -expansina (SacEXP7) altamente expressas nos tecidos de folhas jovens (2 meses) da cultivar SP80-3280 foram produzidas por *P. pastoris*. Em seguida, extratos proteicos enriquecidos com as novas expansinas foram aplicados em ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por método organosolv em condições laboratoriais. Também são apresentados resultados sobre a alteração das propriedades físicas de papel filtro tratado com as novas expansinas recombinantes.

Material e Métodos

Síntese de genes, seleção de transformantes e cultivo em biorreator

Duas expansinas altamente expressas nos tecidos de folhas jovens da cultivar SP80-3280 (β -expansina SacEXP4 e α -expansina SacEXP7) (Santiago et al., 2018) foram escolhidas para produção heteróloga e caracterização funcional. As sequências codificadoras foram selecionadas na base de dados do GenBank (acessos MG204192.1 e MG204152.1) e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado quimicamente de acordo com a seguinte estratégia: vetor de expressão pPICZB, peptídeo sinal nativo, cDNA sintético (sequência nativa), códon de parada nativo. Essa construção permite que a proteína madura secretada pela levedura recombinante não contenha em sua região C-terminal o peptídeo composto pelo epítipo myc e pela cauda de afinidade por histidina (cauda de poli histidina). Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *Escherichia coli* DH10B. Posteriormente foram purificados, linearizados com a endonuclease *PmeI* e transformados em células de *P. pastoris* X-33 (reclassificada como *Komagataella phaffii*) de acordo com o procedimento padrão descrito em EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen).

Os transformantes validados por PCR (com primers 5' AOX e 3' AOX) foram cultivados em condições indutoras da expressão gênica (metanol), com o objetivo de avaliar a secreção das proteínas. Após a triagem de dezenas de transformantes por SDS-PAGE foram selecionadas duas linhagens que produziram as expansinas recombinantes: *P. pastoris*_pPICZB_SacEXP4 T1 e *P. pastoris*_pPICZB_SacEXP7 T2.

O cultivo das linhagens selecionadas e da linhagem controle (*P. pastoris* X-33 transformada com o vetor vazio pPICZB) foi realizado em biorreatores LabFors 5 (INFORS) com 3,6 L de capacidade, contendo 1,5 L de meio mineral de sais. As condições de cultivo foram as seguintes: pH 5,5, 30°C, agitação inicial em 800 rpm e, após obtenção de biomassa, agitação em cascata entre 600 e 1.200 rpm, fluxo de ar controlado em 1 vvm (litros de ar/minuto/ litro de meio) e concentração de pO₂ fixada em 25%. Para obtenção de biomassa, foram adicionados 40 g/L de glicerol. Em seguida, os cultivos foram suplementados em duas etapas: após finalização do glicerol inicial, iniciou-se a fase de transição, adicionando-se glicerol e metanol na concentração de 1 g/L, em seguida 2 g/L, e por último somente metanol (5 g/L). Essa fase de transição durou em média 5 horas. Em seguida, foi iniciada a fase de indução por metanol, sendo adicionados pulsos de metanol (entre 10 e 20 g/L).

Os sobrenadantes contendo as expansinas recombinantes (bem como o sobrenadante da linhagem controle) foram concentrados [entre 10 e 20 vezes] e dialisados em água (5 vezes) em concentrador Amicon (Millipore) com membrana de polietersulfona de 5 kDa. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e a proteína total foi quantificada utilizando kit comercial do ácido bicinonínico (BCA), com albumina de soro bovino (BSA) como padrão de proteína. Os extratos proteicos enriquecidos nas expansinas SacEXP4 e SacEXP7 foram utilizados em diferentes testes.

Confirmação da identidade das expansinas recombinantes por análise proteômica (espectrometria de massas)

Além da análise eletroforética (SDS-PAGE), também foi realizada a análise proteômica (de bandas de gel recortadas) para confirmação da identidade das expansinas recombinantes. No caso, as bandas foram recortadas a partir de gel de poliacrilamida desnaturante corado com Comassie. Essa análise foi realizada por empresa prestadora de serviço na área de proteômica (GENONE). Os dados foram analisados com auxílio do software Proteome Discoverer v2.1 (Thermo Fisher Scientific) usando como base de dados todas as entradas associadas a *Saccharum* existentes na base de dados UniProt.

Efeito das expansinas recombinantes de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7 na sacarificação de substrato celulósico

Os extratos proteicos enriquecidos contendo as expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 foram avaliados na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado pelo método organosolv, conforme metodologia desenvolvida na Embrapa Agroenergia. A proteína BSA foi incluída como controle para corrigir efeitos inespecíficos sobre a atividade da celulase. O extrato proteico da cepa controle também foi incluído na análise. Na avaliação da hidrólise do bagaço de cana pré-tratado, os experimentos foram realizados com 5 mg/mL de biomassa incubada a 900 rpm e 30°C. No ensaio de pré-tratamento, a biomassa foi incubada com extrato proteico concentrado ou BSA (10 mg/g) por 24 h. Após a incubação, a celulase comercial Cellulast (0,48 FPU/g) foi adicionada e a reação foi mantida na mesma temperatura por 24 h. Nos ensaios de sinergismo, adicionou-se extrato proteico concentrado ou BSA em combinação com a celulase comercial e incubou-se durante 24 h.

Determinação da força tênsil e deformação de papel de filtro tratado com as expansinas recombinantes

A influência das expansinas recombinantes na tensão máxima e deformação de papel filtro após incubação foi avaliada utilizando a Máquina Universal de Ensaio AROTEC WDW-20E. Tiras de papel filtro Whatman nº 3 foram cortadas (2 cm x 7 cm) e incubadas a 30°C por 1 h em tampão acetato de sódio 50 mmol/L (pH 4,8) contendo 1,2 mg/mL de cada extrato enriquecido. A força tênsil de tiras de papel filtro Whatman nº3 incubadas em tampão acetato de sódio com 1,2 mg/mL de BSA e tampão acetato de sódio com Uréia 8 mol/L também foi avaliada, como controles negativo e positivo, respectivamente. Após o período de incubação, as tiras de papel foram retiradas do meio tamponado e diretamente fixadas às garras da Máquina Universal de Ensaio. Todas as medidas de tensão foram realizadas utilizando uma célula de carga de 50 kgf, distância entre garras de 40 mm e velocidade de deslocamento das garras de 0,5 mm/min. Ao menos 5 corpos de prova foram utilizados para cada condição e os desvios padrão foram calculados. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

Produção heteróloga das expansinas SacEXP4 e SacEXP7 por *P. pastoris* X-33

As sequências de cDNA das expansinas de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7 foram clonadas no vetor de expressão pPICZB (com peptídeo sinal nativo; sem uma cauda de afinidade na região C-terminal). Transformantes de *P. pastoris* X-33 resistentes a zeocina foram recuperados e confirmados por análise de PCR (Figura 1).

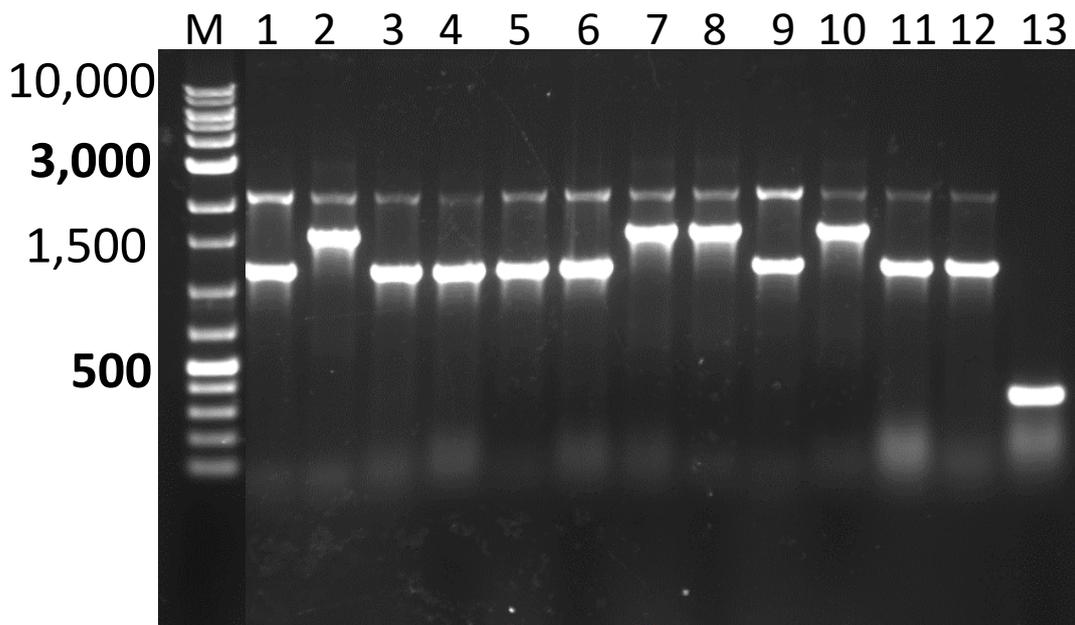


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o resultado da amplificação por PCR de colônia das expansinas de cana-de-açúcar SacExp4 (linhas 1 a 6 mostram diferentes transformantes avaliados) e SacEXP7 (linhas 7 a 12 mostram diferentes transformantes avaliados). Linha 13: PCR de colônia da linhagem controle transformada com o vetor vazio pPICZB. M - 1 Kb Ladder Plus (Sinapse Inc.).

Como esperado, foram visualizados dois fragmentos: um corresponde ao promotor AOX1 (2.200 pb) e o outro corresponde ao tamanho das sequências alvo (SacEXP4 - 837 pb; SacEXP7 - 804 pb), acrescidas de 323 pb (provenientes do vetor), resultando em fragmentos de aproximadamente 1.200 pb (marcados na Figura 1). Os transformantes confirmados por PCR foram cultivados em meio contendo metanol e o perfil de proteínas secretadas foi avaliado por SDS-PAGE (Figura 2).

Conforme observado na Figura 2, as duas expansinas provavelmente migraram no gel como bandas de massa superior (entre 55 e 100 kDa) a prevista para a proteína secretada (aproximadamente 28,38 kDa para SacEXP4 e 26,45 kDa para SacEXP7, calculadas com a ferramenta Compute pI/Mw ExPASy). Essas diferenças podem ser devidas a modificações pós-traducionais realizadas por *P. pastoris* X-33. De fato, algumas expansinas e expansinas-like expressas em *P. pastoris* migram no gel com massas superiores as previstas ou mesmo como múltiplas bandas de massas distintas, inclusive algumas expansinas da própria cana-de-açúcar (Peixoto, 2019).

Para confirmar a identidade das expansinas recombinantes, foi feita a análise proteômica das prováveis bandas (para esta análise foram escolhidas as bandas entre 55 e 70 kDa) correspondentes as expansinas SacEXP4 e SacEXP7 recortadas do gel de poliacrilamida desnaturante corado com Comassie (Figura 3).

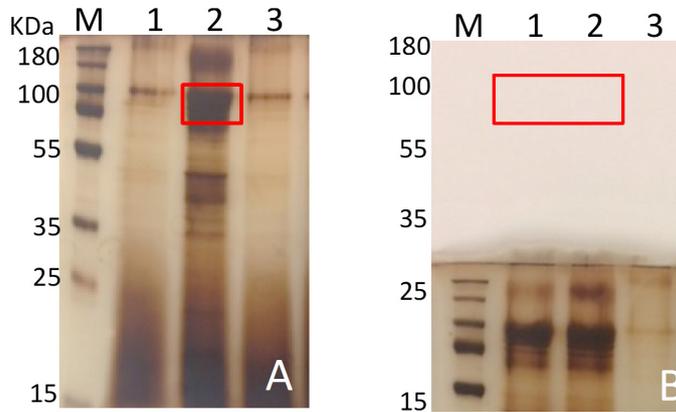


Figura 2. Análise em gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com nitrato de prata, do sobrenadante do cultivo (72 h) de transformantes produtores das expansinas SacEXP4 (A) e SacEXP7 (B). M - Marcador PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa – Thermo Scientific. (A) M - marcador; linhas 1 e 2 - o sobrenadante do cultivo de transformantes produtores da SacEXP4; linha 3 – sobrenadante da linhagem controle (contendo vetor pPICZB vazio). (B) M – marcador; linhas 1 e 2 - sobrenadante do cultivo de transformantes produtores da SacEXP7; linha 3 – sobrenadante da linhagem controle (vetor pPICZB vazio).

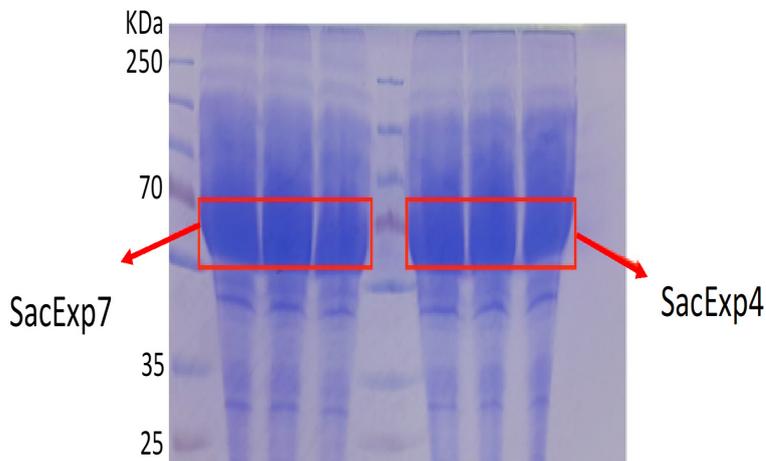


Figura 3. Análise de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida desnaturante corado com Comassie) realizada para recorte das bandas que foram analisadas por técnicas de proteômica para confirmação da identidade das expansinas SacEXP4 e SacEXP7. Em cada poço foram aplicados 64 μ g de proteína, em 3 poços separados cada proteína. O cultivo que originou o sobrenadante avaliado é o mesmo obtido a partir do cultivo em biorreatores. M - Marcador PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific.

Os resultados da análise proteômica da provável banda correspondente a SacEXP4 (massa entre 55 e 70 kDa) revelaram alta identidade de peptídeos com uma expansina denominada “Expansin 36” pertencente a “Saccharum hybrid cultivar”. Enquanto que a análise da provável banda referente a SacEXP7 mostrou identidade com a “Expansin

82" de *Saccharum* (accession number A0A2H4YIR5). Esses dados confirmam que os transformantes selecionados (*P. pastoris*_pPICZB_SacEXP4 T1 e *P. pastoris*_pPICZB_SacEXP7 T2) secretam as expansinas recombinantes.

Efeito das expansinas recombinantes na sacarificação de bagaço de cana

Os extratos proteicos concentrados e dialisados contendo as expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 foram avaliados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método organosolv (Figura 4). Os resultados mostraram que a adição dos extratos contendo as expansinas recombinantes não resultou em aumento significativo de açúcares redutores no final da hidrólise no ensaio de sinergismo (Figura 4), em comparação com os controles, nas condições utilizadas (baixa carga enzimática: 0,48 FPU/g de bagaço). No entanto, no ensaio denominado pré-tratamento, observou-se que a adição da expansina recombinante SacEXP4 na hidrólise resultou em aumento significativo de açúcar redutor total (teste de comparação de médias, $\alpha=0,05$) em comparação com pelo menos dois dos três controles experimentais utilizados (Figura 4).

A extensão da melhoria na hidrólise da biomassa lignocelulósica com a adição de proteínas acessórias como as expansinas ou outras proteínas é altamente dependente do tipo de substrato e pré-tratamento, do teor de sólidos, bem como da fonte e da quantidade de celulase utilizada. De maneira geral, os dados obtidos mostraram que, em uma das condições de hidrólise utilizadas (ensaio de pré-tratamento), a expansina SacEXP4 apresentou um efeito positivo na liberação de açúcar redutor total na sacarificação enzimática de bagaço de cana organosolv, porém esse efeito foi similar ou menor do que o efeito de uma proteína de sacrifício tal como BSA (Figura 4). Assim como observado no presente trabalho, alguns estudos relataram uma ausência de interação sinérgica entre celulases e expansina/expansina-like, ou que o sinergismo não foi significativamente maior do que o observado quando uma proteína controle como BSA é usada na hidrólise (Liu et al., 2015).

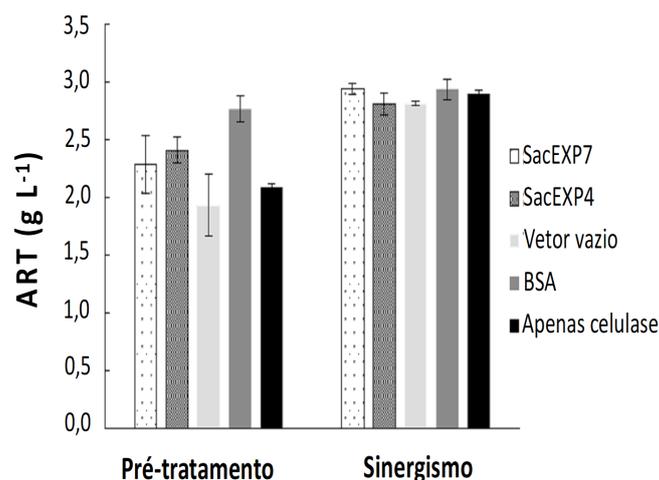


Figura 4. Efeito de expansinas recombinantes de cana-de-açúcar (β -expansina SacEXP4 e α -expansina SacEXP7) na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por método organosolv, utilizando dois tipos de ensaio, denominados "pré-tratamento" e "sinergismo". Os testes foram realizados em triplicata utilizando extratos proteicos enriquecidos com as respectivas proteínas; e as barras de erro indicam as médias \pm desvio padrão (teste de comparação de médias, com $\alpha=0,05$).

Portanto, outras condições devem ser avaliadas, a fim de investigar o potencial sinérgico das expansinas recombinantes obtidas no processo de sacarificação. No presente trabalho, outras aplicações foram testadas para indicar o melhor uso das expansinas recombinantes da cana-de-açúcar, por exemplo, foi avaliada a capacidade dessas proteínas de causar mudanças nas propriedades físicas das fibras de celulose.

Determinação da força tênsil e deformação de papel filtro tratado com as expansinas

A avaliação da resistência à tração de papel filtro incubado com extrato proteico contendo SacEXP4 e SacEXP7 foi realizada para verificar se estas expansinas possuem um efeito de “afrouxamento” do substrato celulósico devido à ruptura de pontes de hidrogênio. A Figura 5 apresenta uma comparação da resistência à tração do substrato celulósico (Whatman Filter Paper nº 3) tratado com BSA (controle negativo), SacEXP4, SacEXP7 e ureia 8M (controle positivo) em pH 4,8, 30°C por 1 h.

A aplicação da β -expansina SacEXP4 resultou em amostras de papel filtro com uma redução de aproximadamente 42% nos valores de tensão máxima, em comparação com o controle negativo (Figura 5). Esse resultado mostra que o efeito de SacEXP4 é pronunciado e similar ao obtido por Artzi et al. (2016) para a expansina-like Cc/EXL1 da bactéria *Clostridium clariflavum* e por Peixoto (2019) para a β -expansina recombinante SacEXP82 de cana-de-açúcar. A aplicação da α -expansina SacEXP7 levou a uma redução de aproximadamente 31% na tensão máxima quando comparada ao controle negativo. Este efeito é comparável ao observado por Kim et al. (2009) para a expansina-like EXLX1 de *Bacillus subtilis* e por Peixoto (2019) para a β -expansina recombinante SacEXP49 de cana-de-açúcar em condições de ensaio idênticas.

Conclusão

As expansinas de cana-de-açúcar SacEXP4 e SacEXP7 produzidas por *P. pastoris* X-33 mostraram-se funcionalmente ativas.

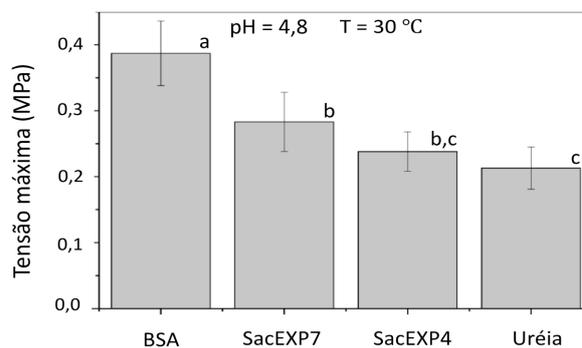


Figura 5. Comparação da resistência à tração de um substrato celulósico (papel de filtro Whatman No. 3) tratado com BSA (controle negativo), SacEXP4, SacEXP7 e ureia 8M (controle positivo). Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey (nível de confiança de 95%).

Isso pode ser concluído devido à acentuada diminuição da força tênsil de fibras de papel filtro tratada com estas proteínas. Quando adicionada 24 h antes da celulase comercial na reação de hidrólise, a β -expansina SacEXP4 apresentou um efeito positivo na liberação de açúcar redutor total na sacarificação de bagaço organosolv, porém esse efeito foi similar ou menor do que o efeito de uma proteína de sacrifício tal como BSA, nas condições utilizadas. As expansinas recombinantes SacEXP4 e SacEXP7 têm potencial para serem aplicadas diretamente (sem etapas de purificação) para modificar as propriedades físicas da fibra de celulose, tal como a do papel de filtro. A produção recombinante mostrada no presente trabalho é o ponto de partida para investigar o potencial dessas expansinas como um bioproduto renovável para aplicações nas indústrias de papel e celulose, ração animal, produtos têxteis, entre outros usos que dependem de mudanças nas propriedades físicas da fibra para obter derivados com características distintas.

Referências

ARTZI, L.; MORAG, E.; SHAMSHOUM, M.; BAYER, E. A. Cellulosomal expansin: functionality and incorporation into the complex. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 61, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, V.5 – Safra 2018/2019, n.4** - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-75, abril de 2019. – Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: Conab, 2013. ISSN 2318-7921. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>

KIM, E. S.; LEE, H. J.; BANG, W. G.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1342 – 1353, 2009.

LIU, X.; MA, Y.; ZHANG, M. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1541-1551, 2015.

PEIXOTO, J. S. G. **Bioprospecção de fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas e identificação de novas proteínas auxiliares para aplicação na conversão de biomassa lignocelulósica**. Brasília, DF, 2019. 175 p. Tese de doutorado, Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica, Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2019.

PEREIRA, V. M.; DIAS, B. B. A.; SANTIAGO, T. R.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C.; FÁVARO, L. C. L. Identification and expression of sugarcane culm-specific expansin genes. In: **Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference - BBEST**, 2017, Campos do Jordão, SP. Resumos ...Campinas: SBE, p. Não paginado, 2017.

SANTIAGO, T. R.; PEREIRA, V. M.; SOUZA, W. R.; STEINDORFF, A. S.; CUNHA, B. A. D. B.; GASPAR, M.; FÁVARO, L. C. L.; FORMIGHIERI, E. F.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C. Genome-wide identification, characterization and expression profile analysis of expansins gene family in sugarcane (*Saccharum* spp.). **PLoS One**, v. 13, p. e0191081, 2018.